

# Methoden zur Konformationsbestimmung an Peptiden und Nukleinsäuren mittels skalarer und dipolarer Kopplungen

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt dem

Fachbereich Chemie, Biochemie und Pharmazie  
der GOETHE UNIVERSITÄT in Frankfurt am Main

von

DANIEL MATHIEU

geboren in Hanau am Main



Frankfurt 2011

(D30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der Goethe-Universität als  
Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. T. Prisner

Gutachter: Prof. H. Schwalbe, Prof. C. Glaubitz

Datum der Disputation: 25.10.2012

*Meinen Eltern*

*„Research is what I’m doing when I don’t know what I’m doing”*

- Wernher von Braun

# Inhaltsverzeichnis

|     |   |     |
|-----|---|-----|
| 1   | Einleitung .....  | 1   |
| 1.1 | Allgemeine Einführung .....   | 1   |
| 1.2 | NMR Parameter .....   | 3   |
| 1.3 | Messung von Kopplungskonstanten .....   | 9   |
| 1.4 | Messung dipolarer Kopplungen .....  | 16  |
| 1.5 | Peptide als Modell für den entfalteten Zustand von Proteinen .....              | 18  |
| 1.6 | Konformationsbestimmung an RNA .....  | 22  |
| 1.7 | Cylindramid und seine Derivate .....  | 24  |
| 2   | Motivation .....  | 26  |
| 3   | Material und Methoden .....   | 28  |
| 3.1 | Peptid Synthese .....   | 28  |
| 3.2 | In vitro RNA-Synthese .....   | 32  |
| 3.3 | Synthese von Guanosinmonothiophosphat .....                                     | 42  |
| 3.4 | Transkription und Modifikation von 5'-Monothiophosphat RNA .....                | 45  |
| 4   | Ergebnisse und Diskussion .....   | 46  |
| 4.1 | Bestimmung von Kopplungskonstanten an Tripeptiden .....                         | 46  |
| 4.2 | Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten an isotopenmarkierter RNA ..... | 62  |
| 4.3 | RNA-Modifikationen zur Einführung von Lanthanid-Bindungsstellen .....           | 75  |
| 4.4 | Konformationsbestimmung der Cylindramid Derivate .....                          | 84  |
| 5   | Zusammenfassung und Ausblick .....  | 88  |
| 6   | Literaturverzeichnis .....  | 90  |
| 7   | Anhang .....  | 103 |
| 7.1 | Abkürzungsverzeichnis .....   | 103 |
| 7.2 | Abbildungsverzeichnis .....   | 106 |
| 7.3 | Pulssequenzen .....   | 111 |
| 7.4 | Python Skripte .....  | 128 |
| 8   | Danksagung .....  | 132 |
| 9   | Lebenslauf .....  | 134 |
| 10  | Liste der Publikationen .....   | 136 |

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Einführung

NMR Spektroskopie ist die einzige Methode, die es ermöglicht, Struktur und Dynamik von Molekülen in Lösung mit atomarer Auflösung zu beobachten. Die NMR-spektroskopische Untersuchung, speziell die von Biomakromolekülen, bedient sich hierbei einer Vielzahl von Parametern, die häufig gleichzeitig sowohl Informationen über die Struktur als auch über die Dynamik enthalten.

Die biomolekulare NMR Spektroskopie findet derzeit vor allem Anwendung in der Untersuchung von gefalteten Proteinen und Nukleinsäuren, ist allerdings nicht darauf beschränkt, denn die einzigartige Möglichkeit, auch hoch dynamische Systeme mit atomarer Auflösung zu charakterisieren, ermöglicht die Untersuchung von entfalteten oder intrinsisch unstrukturierten Systemen, insbesondere Proteinen, die anderen Methoden, wie zum Beispiel der Röntgenkristallographie, nicht zugänglich sind.

Auch wenn die ersten Methoden zur Strukturbestimmung bereits vor mehreren Jahrzehnten bekannt und angewendet wurden, besteht weiterhin Bedarf an der Entwicklung neuer Methoden – entweder, um völlig neue Parameter bestimmen zu können oder um die Messung der bereits untersuchten Parameter für anspruchsvollere Systeme zu ermöglichen.

Die Weiterentwicklung einerseits der Instrumente und andererseits der biochemischen und NMR spektroskopischen Methoden, ermöglicht heute die Untersuchung von Systemen, die bis vor einigen Jahren noch undenkbar gewesen wäre, was ihre Größe und Komplexität angeht.

Für das molekulare Verständnis von intrinsisch unstrukturierten Systemen, die durch schnelle konformationelle Mittelung beschrieben werden müssen, sind moleküldynamische Messungen unerlässlich. Denn mit der Zahl frei rotierbarer Torsionen wächst die Zahl der zugrunde liegenden Konformationen, und die Korrelation der Torsionswinkelmittelung kann mit NMR-spektroskopischen Methoden allenfalls auf

lokaler Ebene charakterisiert werden. Andererseits werden moleküldynamische Messungen Kraftfelder an und zur empirischen Eichung dieser Kraftfelder werden Messungen an kleinen Systemen, z.B. homopolymeren Peptiden, verwendet. Die NMR-Spektroskopie und die MD-Simulation stehen also in einem regen Austausch, und die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit der Messung und Validierung solcher Parameter an Modellsystemen zur Verbesserung von MD-Kraftfeldern.

## 1.2 NMR Parameter

### 1.2.1 Der Kern-Overhauser-Effekt

Ein wichtiger NMR-spektroskopischer Parameter ist der Kern Overhauser Effekt (OVERHAUSER 1953b; OVERHAUSER 1953a; ANET und BOURN 1965). Hierbei handelt es sich um den Magnetisierungstransfer durch den Raum mittels dipolarer Kopplung. Bei dem Relaxationsweg, der hier zum Magnetisierungstransfer führt, spricht man allgemein von kreuzkorrelierter Relaxation. Die kreuzkorrelierte Relaxationsrate zwischen zwei benachbarten Protonen ist gegeben durch

$$\sigma_{H,H}^{NOE} = \frac{d^2 \tau_c}{5} \left[ -1 + \frac{6}{1 + 4\omega_0^2 \tau_c^2} \right] \quad (1.1)$$

wobei  $\tau_c$  die Rotationskorrelationszeit ist und  $\omega_0$  die Larmor Frequenz. Die dipolare Wechselwirkung  $d$  ist gegeben durch

$$d = \mu_0 h \gamma_H^2 / (\sqrt{8} r_{H,H}^3 \pi^2) \quad (1.2)$$

wobei  $\mu_0$  die Permeabilität des Vakuums ist,  $h$  das Planck'sche Wirkungsquantum,  $\gamma_H$  das gyromagnetische Verhältnis und  $r$  der Abstand der benachbarten Spins.

Die Effizienz des Magnetisierungstrfers ist demnach abhängig von  $r^6$ . Diese Abhängigkeit führt zu einem dazu, dass zwei benachbarte Protonen typischerweise nur bis zu einem Abstand von etwa 5 Å einen NOE aufweisen. Zum anderen ist es möglich, aus der Intensität eines NOESY-Kreuzsignals den Abstand zweier Protonen zu bestimmen.

Im Fall von Proteinen oder Peptiden ermöglicht das Vorhandensein bestimmter NOE-Kreuzsignale außerdem die schnelle Identifizierung von bestimmten Sekundärstrukturelementen. So sind beispielsweise NOE-Konnektivitäten der Aminosäuren  $i$  und  $i+3$  charakteristisch für  $\alpha$ -helikale Bereiche. Sequentielle, jeweils paarweise NOEs sind wiederum charakteristisch für  $\beta$ -Faltblatt Strukturen. Die



Unterscheidung von parallelen und antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgrund des NOE-Musters ist ebenfalls möglich (siehe Abbildung 1.1).

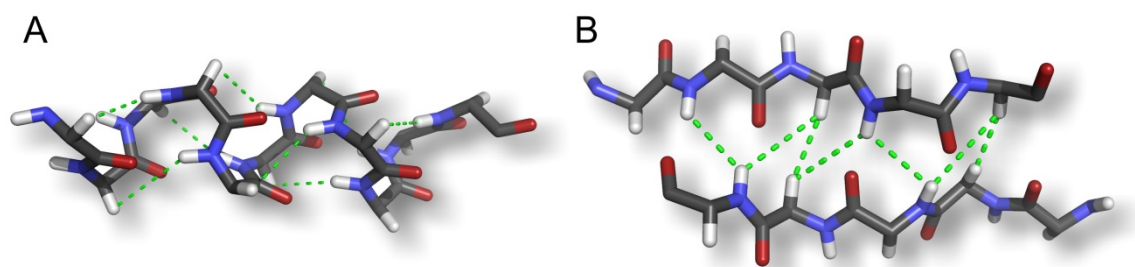


Abbildung 1.1 NOE-Kontakte innerhalb einer  $\alpha$ -Helix (A) und eines antiparallelen  $\beta$ -Faltblattes (B). Gezeigt sind jeweils die Protonen-Protonen Abstände  $< 5 \text{ \AA}$  für  $H^N$  bzw.  $H^\alpha$ .

NOE-Intensitäten sind die meist verwendeten Parameter in der NMR-Strukturbestimmung. Sie dienen allerdings nicht ausschließlich der Strukturbestimmung. Im Fall von Ribonukleinsäuren (RNA) beispielsweise ist die NOE-basierte Zuordnung oft die einzige Möglichkeit, eine sequenzielle Zuordnung zu erhalten, da die einzelnen Nukleotide, nicht wie im Fall von Proteinen, durchgängig durch NMR aktive Kerne verbunden sind.

## 1.2.2 Skalare Kopplung

Ein weiterer NMR Parameter, der Strukturinformationen liefert, ist die skalare Kopplung. Die skalare Kopplung oder J-Kopplung wird im Gegensatz zu dipolarer Kopplung nicht durch den Raum, sondern durch Bindungen vermittelt, genauer gesagt durch die Bindungselektronen. Ähnlich wie bei der dipolaren Kopplung hängt die Größe der skalaren Kopplung von den gyromagnetischen Verhältnissen der gekoppelten Kerne ab. Zusätzlich hängt der beobachtete Wert der skalaren Kopplung allerdings auch von der Art und Geometrie der vermittelnden Bindungen ab, was wiederum den Rückschluss aus gemessenen Kopplungen auf Dihedralwinkel ermöglicht. Die Abhängigkeit, insbesondere der  $^3J$ -Kopplungen, wird durch die Karplus-Gleichung (KARPLUS 1959; KARPLUS 1963) beschrieben. In der allgemeinen Form für vicinale Kopplungskonstanten lautet diese

$$^3J_{ij}(\theta) = A \cos^2 \theta + B \cos \theta + C \quad (1.3)$$

wobei  $\theta$  der eingeschlossene Dihedralwinkel ist und A, B und C empirisch bestimmte, bindungsspezifische Konstanten darstellen. Die Karplus-Gleichung sowie die Parameter für die gängigsten Anwendungen im Bereich der NMR-Spektroskopie sind in der Regel veröffentlicht (BYSTROV, GAVRILOV *et al.* 1977; WIRMER, SCHLÖRB *et al.* 2008), unterliegen allerdings ständiger Verfeinerung durch empirische (SCHMIDT, BLÜMEL *et al.* 1999; SCHMIDT 2007) oder computergestützte Methoden (CASE, SCHEURER *et al.* 2000). Wie die Arbeit von Bytrov *et al.* zeigt, waren bereits 1977 umfangreiche Parameter verfügbar, trotzdem besteht noch heute Optimierungsbedarf.

Eine Schwierigkeit in der Interpretation von skalaren Kopplungskonstanten liegt in der Form der Karplus-Kurve. Je nach Größe der gemessenen Kopplung ist diese bis zu vierfach entartet, was eine eindeutige Aussage über den Dihedralwinkel auf Basis nur einer gemessenen Kopplung meist unmöglich macht. Da je nach Art der Bindung, bis zu neun vicinale Kopplungskonstanten denselben Dihedralwinkel beschreiben, kann die Entartung in der Regel durch Messung mehrerer  $^3J$  Kopplungen aufgehoben werden (siehe Abbildung 1.2).

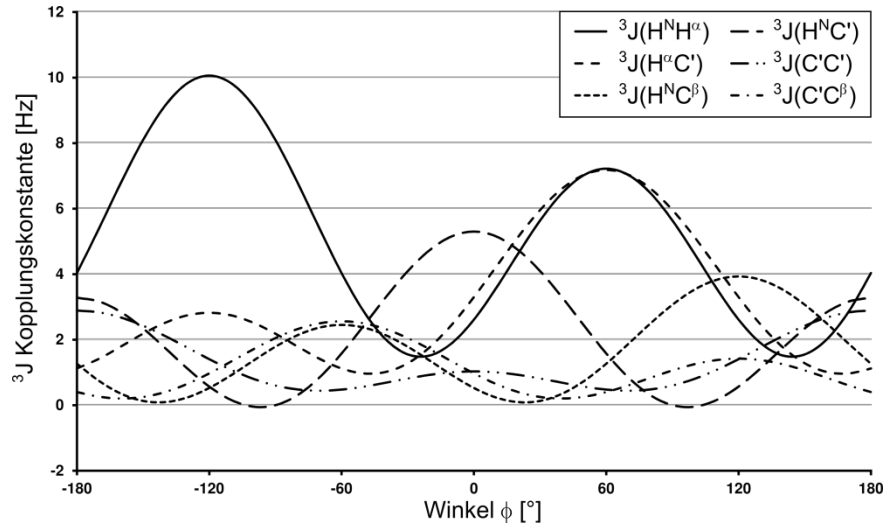


Abbildung 1.2 Karplus-Kurven für den Protein Rückgrat Winkel  $\phi$ . Gezeigt ist die Größe von sechs vicinalen Kopplungskonstanten auf der Basis bekannter Karplus Parametrisierung (SCHMIDT 2007).

Neben der klassischen Karplus-Beziehung existieren noch weitere, meist empirisch bestimmte Gleichungen die z.B. die Winkelabhängigkeit von  $^1J$  und  $^2J$  Kopplungskonstanten beschreiben (WIRMER, SCHLÖRB *et al.* 2008; NOZINOVIC, GUPTA *et al.* 2011).

### 1.2.3 Dipolare Restkopplungen

Bei der dipolaren Restkopplung (RDC) handelt es sich um eine unvollständig gemittelte dipolare Kopplung, die dann auftritt, wenn ein Molekül in Lösung in seiner freien Rotation eingeschränkt wird. Dipolare Kopplungen sind durch den Raum vermittelte Wechselwirkungen, deren Größe von der relativen Orientierung zum externen Magnetfeld abhängt.

$$H_{ij}^D(t) = -\frac{\gamma_i \gamma_j \mu_0 h}{8\pi^3 r_{ij}^3(t)} I_{iz} I_{jz} \frac{(3\cos^2 \theta_{ij}(t) - 1)}{2} \quad (1.4)$$

Der Hamiltonoperator der dipolaren Kopplung  $H^D$  wird bestimmt durch die gyromagnetischen Verhältnisse  $\gamma_{ij}$  der gekoppelten Spins, die Drehmomentoperatoren  $I_{ijz}$ , den Abstand zwischen den beiden Spins  $r_{ij}$  sowie durch den Winkel  $\theta_{ij}$ , der vom Interspinvektor und dem äußeren Magnetfeld  $B_0$  aufgespannt wird.

Für ein Molekül, das frei in Lösung rotiert, ist der Term  $3\cos^2\theta(t)-1$  im zeitlichen Mittel gleich null, weshalb keine dipolare Kopplung zu beobachten ist. Im Falle eines Einkristalls mit entsprechender Orientierung zum Magnetfeld können dipolare Kopplungen bis zu 25 kHz für eine NH-Bindung beobachtet werden (PRESTEGARD, BOUGAULT *et al.* 2004). In der Regel versucht man, eine Vorzugsorientierung für das Molekül einzuführen, die im zeitlichen Mittel um Faktor  $10^3$  bis  $10^4$  kleinere Werte liefert.

Die Zeitabhängigkeit der Orientierung kann durch die Einführung eines Molekülkoordinatensystems beschrieben werden, das die gemittelte Orientierung des Moleküls repräsentiert. Die einzelnen Bindungsvektoren verhalten sich in Abwesenheit von interner Dynamik starr bezogen auf das Molekülkoordinatensystem (siehe Abbildung 1.3).

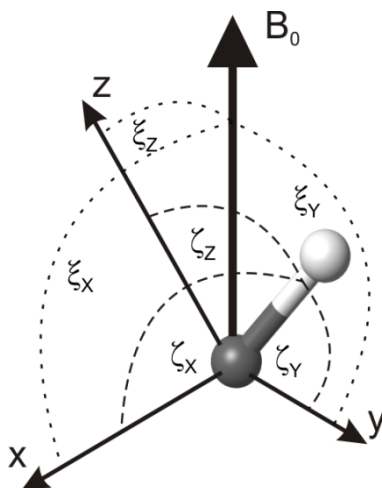


Abbildung 1.3 Exemplarischer Bindungsvektor im Molekülkoordinatensystem. Die Winkel  $\zeta$  beschreiben die Orientierung des Bindungsvektors relativ zum Molekülkoordinatensystem, die Winkel  $\xi$  geben die Orientierung des Molekülkoordinatensystems in Bezug auf das externe Magnetfeld an.

Der Winkel  $\theta_{ij}$  kann unter dieser Annahme durch die Winkel  $\zeta_x, \zeta_y, \zeta_z$  und  $\xi_x, \xi_y, \xi_z$  ausgedrückt werden. In diesem Fall lässt sich die Vorzugsorientierung (der sogenannte *alignment tensor*) durch eine 3 x 3 Matrix ausdrücken für dessen Elemente gilt:

$$A_{kl} = \frac{3}{2} \langle \cos \zeta_k \cos \zeta_l \rangle - \frac{1}{2} \delta_{kl} \quad (1.5)$$

Die Größe der dipolaren Kopplung ist dann gegeben durch

$$D_{ij} = -\frac{\gamma_i \gamma_j \mu_0 h}{8\pi^3 r_{ij,eq}^3} \sum_{kl} A_{kl} \cos \zeta_k \cos \zeta_l \quad (1.6)$$

bzw. nach Diagonalisierung und Transformation ins Polarkoordinatensystem durch

$$D_{ij}(\theta, \varphi) = -\frac{\gamma_i \gamma_j \mu_0 h}{16\pi^3 r_{ij,eq}^3} \left( A_a (3 \cos^2 \theta - 1) + \frac{3}{2} A_r \sin^2 \theta \cos 2\varphi \right) \quad (1.7)$$

wobei  $A_a$  die axial- und  $A_r$  die rhombische Komponente des Orientierungstensors sind. Zusätzliche Parameter sind die Euler-Winkel  $\alpha, \beta$  und  $\gamma$ , die die Lage des diagonalisierten Tensors beschreiben. Insgesamt sind also fünf unabhängige Parameter nötig, um den Orientierungstensor vollständig zu definieren.

## 1.3 Messung von Kopplungskonstanten

Das Vorhandensein von Kopplungskonstanten führt in der Regel zum Aufspalten eines Signals in zwei oder mehr Signale, wobei die Multiplizität von der Anzahl sowie der Spinquantenzahl der gekoppelten Spins abhängt. In der biomolekularen NMR-Spektroskopie müssen allerdings beinahe ausschließlich Spin  $\frac{1}{2}$  Kerne berücksichtigt werden.

Im einfachsten Fall kann die Bestimmung der Kopplungskonstante durch das Ausmessen des Abstands zweier Signal Komponenten erfolgen. Diese Methode liefert allerdings nur dann genaue Ergebnisse, wenn beispielsweise die beiden Komponenten eines Dubletts bis zur Basislinie des Spektrums aufgelöst sind, also wenn die Linienbreite kleiner ist als die Kopplungskonstante.

Im Fall von größeren Systemen wie Proteinen oder RNA Molekülen ist die Messung von Kopplungskonstanten erschwert. Zum einen ist die natürliche Linienbreite oftmals größer als die zu bestimmende Kopplung, zum anderen führt die große Anzahl von Signalen meistens dazu, dass wenn überhaupt nur sehr wenige Signale im eindimensionalen Spektrum aufgelöst werden können. Die Messung von Kopplungskonstanten an komplexen Systemen erfolgt daher fast immer mittels mehrdimensionaler Spektren. Die Art der Spektren lässt sich grundsätzlich in Methoden zur Frequenz- und Intensitätsbasierten Messung von Kopplungskonstanten unterteilen.

### 1.3.1 Frequenzbasierte Methoden

Mit Hilfe von frequenzbasierten Methoden ist es möglich Kopplungskonstanten aus dem Abstand von zwei oder mehr Signalen zu bestimmen. Der einfachste Fall ist ein eindimensionales Spektrum. Im Fall von kleinen Molekülen ist dies in der Regel die schnellste und genaueste Möglichkeit der Bestimmung (siehe Abbildung 1.4).

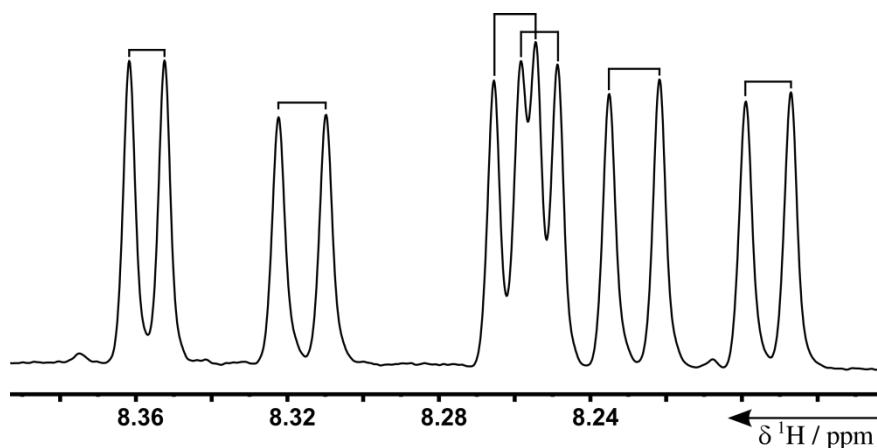


Abbildung 1.4 1D Spektrum eines Peptides, gezeigt ist die Rückgrat NH Region. Die Signale sind jeweils durch die  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$ -Kopplung aufgespalten.

Zur Bestimmung vor allem von  $^1J$  heteronuklearen Kopplungskonstanten werden oft gekoppelte HSQC-basierte Spektren verwendet (siehe Abbildung 1.5).  $^1J$  Kopplungen sind in der Regel relativ groß im Vergleich zur Linienbreite, daher lassen sich die Dublett-komponenten normalerweise gut separieren.

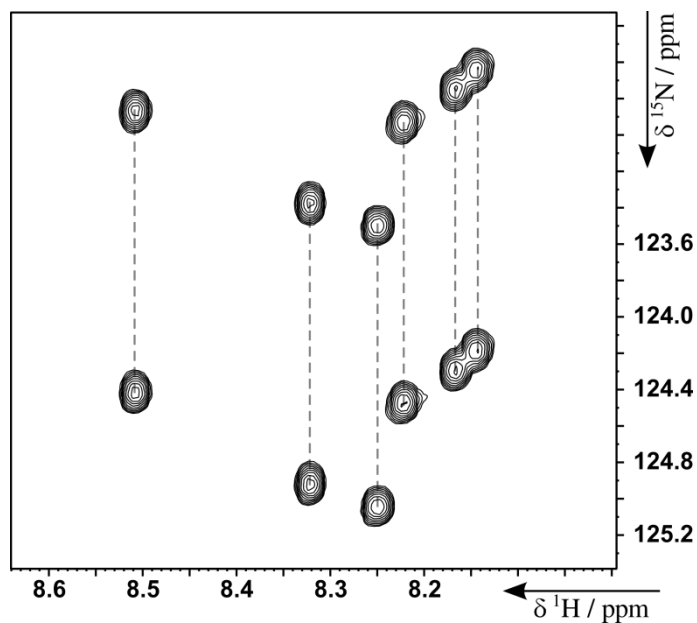


Abbildung 1.5  $\omega_1$ -gekoppeltes  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC eines 7mer Peptides. Die Signale sind in der indirekten Dimension durch die  $^1J(\text{NH})$ -Kopplung aufgespalten.

Tritt durch die Signalverdopplung aufgrund der Kopplung selbst zusätzliche Überlagerung auf, werden in der Regel IPAP Experimente verwendet um zu separieren (OTTIGER, DELAGLIO *et al.* 1998). Für ein IPAP Spektrum werden zwei Experimente aufgenommen, eines mit der Kopplung inphase eines in antiphase. Addition bzw. Subtraktion der beiden Experimente liefert zwei Spektren, die jeweils nur eine der beiden Dublett Komponenten enthalten (siehe Abbildung 1.6).

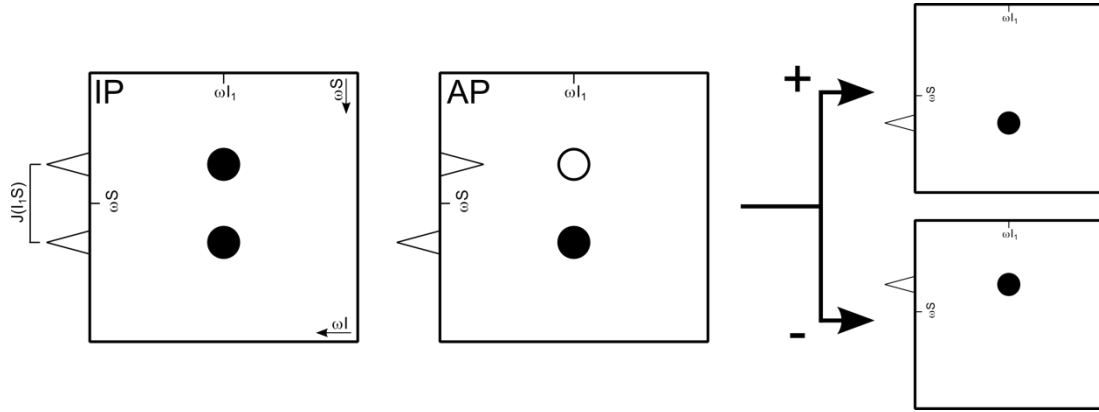


Abbildung 1.6 IPAP Experiment.

Eine weitere verbreitete Methode zur frequenzbasierten Messung vor allem sehr kleiner Kopplungen ist das E.COSY-Experiment (GRIESINGER, SØRENSEN *et al.* 1986). In diesem Experiment werden eingeschränkte Kohärenztransfers verwendet um nur verbundene Übergänge zu beobachten.

In der Praxis wird die zu messende, in der Regel kleine Kopplung in Gegenwart einer größeren passiven Kopplung gemessen. Die Form eines E.COSY Kreuzsignal-Musters lässt sich am Beispiel eines  $I_1I_2S$  Spinsystems verdeutlichen wobei S der passive Spin ist. Der Kohärenztransfer von Spin  $I_1$  zu Spin  $I_2$  führt zunächst zu zwei Zuständen:

$$2I_{1x}I_{2z} \sin(\pi J(I_1I_2)t_1) \cos(\pi J(I_1S)t_1) \cos(\omega_{I_1}t_1) \quad (1.8)$$

$$4I_{1x}I_{2z}S_z \sin(\pi J(I_{1x}I_{2z}t_1)) \sin(\pi J(I_{1x}St_1)) \sin(\omega_{I_1}t_1) \quad (1.9)$$

wobei der erste Zustand ein Kopplungsmuster beschreibt, antiphase in Bezug auf  $I_1$  und  $I_2$  sowie inphase in Bezug auf  $I_1$  und S. Der zweite Zustand beschreibt ein zweifach antiphase



Kopplungsmuster. Das tatsächlich auftretende Kopplungsmuster kann als Überlagerung dieser beiden Zustände beschrieben werden (siehe Abbildung 1.7).

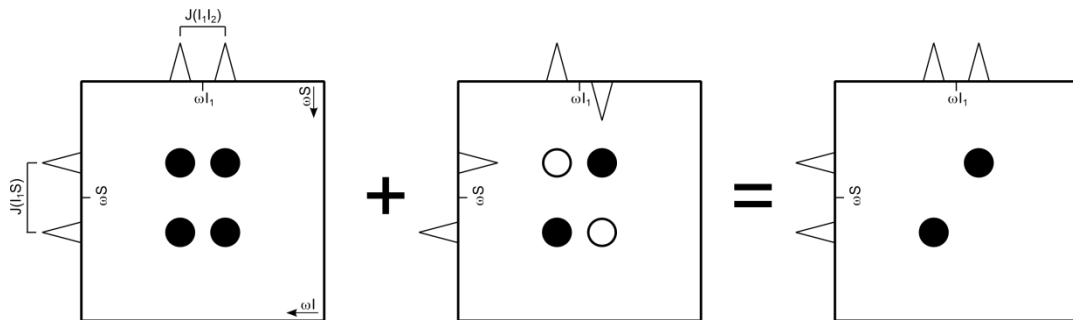


Abbildung 1.7 E.COSY Kreuzpeakmuster als Überlagerung des inphase und antiphase Kopplungsmusters.

Diese Methode erlaubt es, den Überlapp der beiden Dublett Komponenten aufzulösen, der es sonst unmöglich machen würde die Kopplungskonstante präzise zu extrahieren.

Eine weitere Methode zum Extrahieren von kleinen Kopplungen, die ähnlich wie das E.COSY-Experiment eine größere passive Kopplung ausnutzt, ist das Doppelquanten-Nullquanten (DQ/ZQ) Experiment (SCHWALBE 1993; REXROTH, SCHMIDT *et al.* 1995). In diesem Experiment werden für ein Spinsystem  $I_1I_2S$  selektiv beispielsweise  $I_1S$  Doppel- und Nullquantenterme erzeugt. Diese entwickeln jeweils die Summe bzw. Differenz der chemischen Verschiebungen  $\omega_1$  bzw.  $\omega_S$ , sowie die Summe und Differenz der Kopplungen  $J(I_1S)$  und  $J(I_1I_2)$  (siehe Abbildung 1.8). Durch den Vergleich der beiden Experimente lässt sich aus  $J_{DQ} - J_{ZQ} = 2 J(I_1I_2)$  die aktive  $I_1I_2$  Kopplung extrahieren.

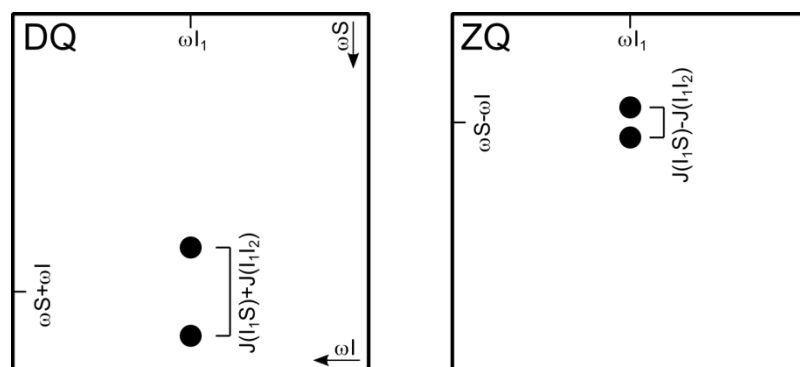


Abbildung 1.8 Prinzip des Doppelquanten-/Nullquanten Experiments.

### 1.3.2 Intensitätsbasierte Methoden

Intensitätsbasierte Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten nutzen in der Regel die Tatsache aus, dass während einer Zeit  $\tau$  die Evolution der Kopplung zwischen zwei Kernen I und S beschrieben werden kann durch

$$I_x \xrightarrow{2\pi J_{IS} I_z S_z \tau} I_x \cos(\pi J_{IS} \tau) + 2I_y S_z \sin(\pi J_{IS} \tau) \quad (1.10)$$

Eine Möglichkeit, diese Tatsache zur Messung von Kopplungskonstanten zu nutzen ist die Messung quantitativer J-Korrelationen (BAX, VUISTER *et al.* 1994). Hier werden Spektren erzeugt, die ein Referenz- und ein Kreuzsignal enthalten. Je nach Art des Kohärenztransfers ist das Referenzsignal üblicherweise Kosinusquadrat moduliert für die De- und Rephasierung des Signals, das Kreuzsignal Sinusquadrat moduliert. Die Kopplungskonstante kann aus dem Verhältnis der Intensitäten der beiden Signale ermittelt werden, das also proportional zum Tangensquadrat der Kopplungskonstante ist.

Die wahrscheinlich bekannteste Anwendung ist das  $H^N H^\alpha$  Experiment zur Messung der  $^3J(H^N H^\alpha)$  Kopplung in Proteinen mittels quantitativer J-Korrelation (VUISTER und BAX 1993) (siehe Abbildung 1.9).

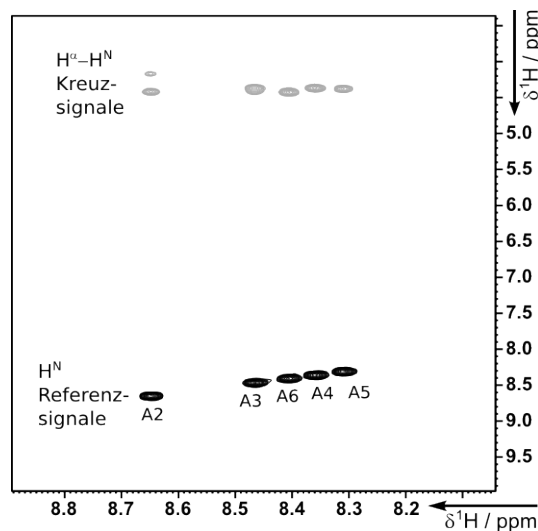


Abbildung 1.9  $H^N H^\alpha$  Experiment am Beispiel des Peptides Ala<sub>6</sub>.

Die Präzision der Messung hängt hierbei nicht von der spektralen Auflösung ab, sondern im Wesentlichen vom Signal-zu-Rausch Verhältnis. Um eine präzise Messung der Kopplungskonstante zu gewährleisten, ist es nötig, Referenz- und Kreuzsignalintensität mit möglichst hoher Intensität zu messen, wobei die relativen Intensitäten von der Größe der zu bestimmenden Kopplungskonstante sowie der Mischzeit für den Kohärenztransfer abhängig sind.

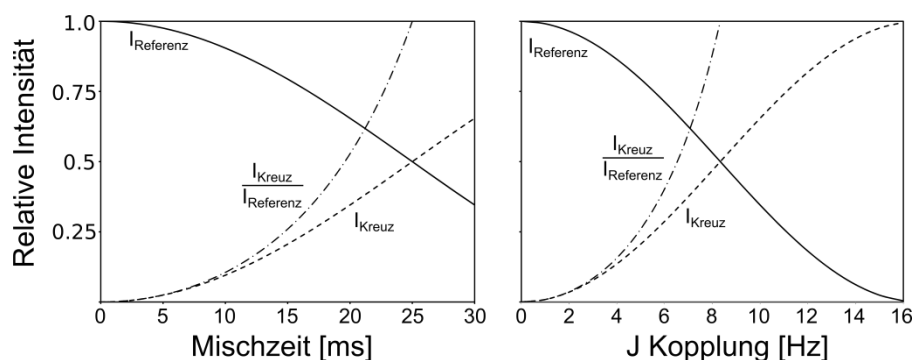


Abbildung 1.10 Abhängigkeit der Intensitäten bei quantitativer J Korrelation von der Mischzeit für eine Kopplung von 10 Hz (links) sowie von der J-Kopplung für eine Mischzeit von 30 ms (rechts).

Die Messung erfordert also die Kenntnis der Größe der zu messenden Kopplungskonstanten und ihre Genauigkeit hängt von der Größe der zu bestimmenden Kopplung ab, je kleiner die Kopplung, umso ungenauer die Messung. Die Methode kann dann besonders gut angewendet werden, wenn die Variation der zu messenden Kopplungskonstanten relativ klein ist, beispielsweise im Fall der  $H^N H^\alpha$  Kopplung.

Eine weitere Möglichkeit zur intensitätsbasierten Messung von Kopplungskonstanten ist die J-Modulation. Hier wird die Intensität eines einzelnen Signals in Abhängigkeit von einer variablen Mischzeit beobachtet, wobei die Entwicklung einer oder mehrerer Kopplungen zur Modulation der Intensität führt. Ein Beispiel hierfür ist das J-modulierte  $^1H, ^{15}N$  HSQC Experiment (WIRMER und SCHWALBE 2002) zur Messung von  $^1J(NC^\alpha)$  und  $^2J(NC^\alpha)$  (siehe Abbildung 1.11).

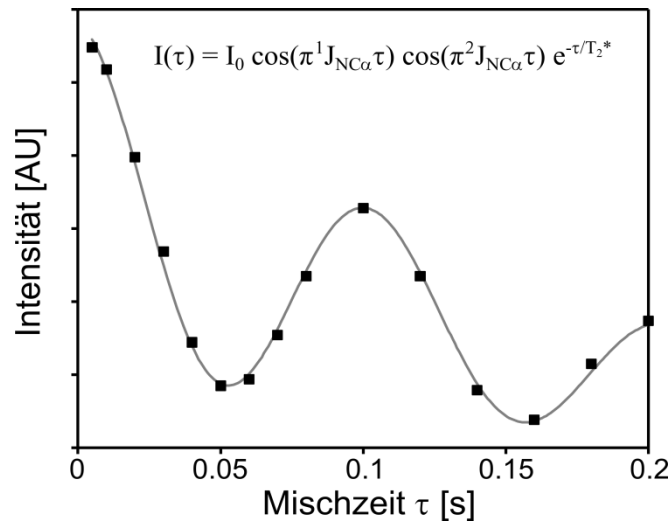


Abbildung 1.11 Intensitätsverlauf eines  $J$ -modulierten  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$  HSQC Spektrums zur Bestimmung von  $^1J(\text{NC}^\alpha)$  und  $^2J(\text{NC}^\alpha)$ , gezeigt für das Signal A3 aus dem Peptid Ala<sub>6</sub>.

Der Nachteil bei der  $J$ -modulierten Messung ist die Tatsache, dass es notwendig ist, die Kopplung einmal vollständig zu entwickeln. Die Methode ist daher für die Messung sehr kleiner Kopplungen nicht anwendbar. So würde es beispielsweise eine halbe Sekunde dauern eine 2 Hz Kopplung zu entwickeln, was aufgrund der gleichzeitig aktiven  $T_2$  Relaxation nicht möglich ist.

## 1.4 Messung dipolarer Kopplungen

Dipolare Restkopplungen treten als Beitrag zur gesamt beobachteten Kopplung auf, das heißt sie können in der Regel nicht individuell sondern nur als die Summe von skalarer und dipolarer Kopplung gemessen werden.

Üblicherweise werden zwei Proben, orientiert und nicht orientiert untersucht. Die dipolare Restkopplung ist dann die Differenz der beiden bestimmten Kopplungskonstanten. Um dipolare Kopplungen interpretieren zu können werden üblicherweise die  $^1\text{D}$  dipolaren Kopplungen, also entlang einer Bindung gemessen, da dann der Abstand der beiden beteiligten Kerne bekannt ist. Zur Messung der dipolaren Kopplungen finden dieselben Methoden Anwendung wie zur Messung skalarer Kopplungen (siehe Kapitel 1.3), hauptsächlich also nicht entkoppelte HSQC basierte Experimente. Allerdings ist bei der Messung von dipolaren Kopplungen in Sequenzen, die INEPT-Schritte enthalten, auf den Umstand zu achten, dass De- und Refokussierungsschritte nicht einfach auf die unterschiedlichen Kopplungen abgestimmt werden können.

### 1.4.1 Probenorientierung

Wie bereits erwähnt ist die Voraussetzung für das Auftreten dipolarer Restkopplungen die partielle Orientierung des zu untersuchenden Moleküls in Bezug auf das äußere Magnetfeld. Um eine Vorzugsorientierung zu erzielen, gibt es entweder die Möglichkeit externe Orientierungsmedien zu verwenden, oder Modifikationen am Molekül selber vorzunehmen, die eine Orientierung im Magnetfeld ermöglichen.

Bei externen Orientierungsmedien handelt es sich in der Regel um gestreckte oder komprimierte Gele (SASS, MUSCO *et al.* 2000; TYCKO, BLANCO *et al.* 2000; CHOU, GAEMERS *et al.* 2001) sowie um flüssigkristalline Medien (TJANDRA und BAX 1997; RÜCKERT und OTTING 2000). In beiden Fällen führt eine sterische Behinderung der freien Rotation zu einer partiellen Orientierung. Eine Ausnahme bilden hier Orientierungsmedien wie z.B. Phagen (HANSEN, MUELLER *et al.* 1998), die eine

Ausrichtung des zu untersuchenden Moleküls durch elektrostatische Wechselwirkung verursachen.

Eine weitere Möglichkeit, vor allem Proteine im Magnetfeld zu orientieren, besteht in der Einführung eines Lanthanidkations. Lanthanide besitzen einen anisotropen Tensor, der die magnetische Suszeptibilität beschreibt (BERTINI, JANIK *et al.* 2001), was zu einer Ausrichtung im Magnetfeld führt. Sind sie rigide an ein Molekül gebunden, führt dies zu einer Orientierung des gesamten Komplexes im Magnetfeld (SU und OTTING 2010). Der Grad der Orientierung ist außerdem variabel durch die Wahl des paramagnetischen Lanthanidions.

Im Fall von RNA ist die Ausrichtung der Proben schwieriger zu erreichen. Viele der für Proteine verwendeten Orientierungsmedien interagieren mit RNA, was ihre Verwendung ausschließt. Eine Möglichkeit der Orientierung ist die Ausrichtung mittels Phagen. Des Weiteren besitzen RNA Moleküle, sofern sie in einer gestreckten Konformation vorliegen, aufgrund der parallel angeordneten Basen eine anisotrope magnetische Suszeptibilität, was zu einer Ausrichtung im Magnetfeld führt (BRYCE, BOISBOUVIER *et al.* 2004). Dieser als *field alignment* bezeichnete Effekt kann außerdem durch Verlängerung eines RNA-Stranges verstärkt werden (ZHANG, SUN *et al.* 2006; ZHANG, STELZER *et al.* 2007).

## 1.5 Peptide als Modell für den entfalteten Zustand von Proteinen

Die Untersuchung von kurzen Peptiden spielt eine wichtige Rolle beim Versuch, den entfalteten Zustand von Proteinen zu charakterisieren.

Entfaltete Proteine sind zum einen interessant, um die Proteinfaltung untersuchen zu können, außerdem ist ein nicht unerheblicher Teil funktionaler Proteine im nativen Zustand nicht gefaltet (DOSZTANYI, CHEN *et al.* 2006; DUNKER, SICKMEIER *et al.* 2007). Man spricht dabei von sogenannten intrinsisch unstrukturierten Proteinen (IUPs).

Der vollständig entfaltete Zustand, meist *random-coil* bezeichnet, wurde schon vielfach mit Hilfe kurzer, sogenannter *random-coil* Peptide charakterisiert (RALEIGH, EVANS *et al.* 1992; SMITH, FIEBIG *et al.* 1996; WIRMER, SCHLÖRB *et al.* 2008). Jegliche Abweichung von der zufälligen Struktur kann hierbei Aufschluss geben über die strukturellen Eigenschaften, die z.B. die Faltung einleiten. Ein weiterer Grund, den entfalteten Zustand anhand einzelner Bereiche zu betrachten, ist die Tatsache, dass Fehlfaltungen oftmals durch einzelne Punktmutationen, sprich den Austausch einer einzelnen Aminosäure, eingeleitet werden. Diese Punktmutationen sind Grund für das Auftreten vieler, vor allem neurodegenerativer Krankheiten (TARTAGLIA, PAWAR *et al.* 2008; CHITI und DOBSON 2009; GERUM, SCHLEPCKOW *et al.* 2010; KUMAR, SREERAMULU *et al.* 2010).

Die Untersuchung von Peptiden ist nicht nur Gegenstand NMR-spektroskopischer Untersuchungen sondern auch diverser anderer spektroskopischer Methoden (FTIR (EKER, CAO *et al.* 2002; SCHWEITZER-STENNER 2009; HAGARMAN, MEASEY *et al.* 2010), UVCD (TIFFANY und KRIMM 1968; WOUTERSEN und HAMM 2000)) sowie computergestützter Methoden wie MD Simulationen (GARCIA und SANBONMATSU 2002; MU, KOSOV *et al.* 2003) oder ab-initio Berechnungen (BEACHY, CHASMAN *et al.* 1997). Die Kombination bzw. der Vergleich verschiedener Methoden erlaubt es, die Eigenschaften dieser Peptide zum Teil sehr genau zu charakterisieren. Gerade der Vergleich spektroskopischer und computergestützter Methoden liefert jedoch auch teilweise widersprüchliche Ergebnisse (BEST, BUCHETE *et al.* 2008).

Eine Schwierigkeit der Beschreibung von entfalteten Proteinen oder Peptiden liegt in der konformationellen Flexibilität. Um ein entfaltetes Peptid bzw. Protein beschreiben zu können, bedarf es eines Ensembles, einer Vielzahl an Konformationen, die in der Regel schnell ineinander übergehen können. Die Dynamik dieser konformationellen Veränderungen findet in der Regel auf der Nanosekunden bis Mikrosekunden Zeitskala statt. Da die Veränderungen schnell ablaufen, gemessen an der Zeitskala der meisten spektroskopischen Methoden, sind die NMR-Parameter, insbesondere J-Kopplung, dipolare Restkopplung und chemische Verschiebung, Ensemble-gemittelt.

Die Konformation einer Aminosäure ist bestimmt durch drei Rückgratwinkel, von denen allerdings nur die Winkel  $\phi$  und  $\psi$  variieren, außerdem durch die Seitenkettenwinkel  $\chi_1$ . Die Winkel  $\phi$ ,  $\psi$  und  $\chi_1$  sind jedoch nicht willkürlich populierte, sondern vielmehr aus sterischen und energetischen Gründen miteinander korreliert. Die beobachtete Konformationsverteilung lässt sich daher nicht durch ein rein statistisches Modell erklären (BRANT und FLORY 1965b; BRANT und FLORY 1965a).

Die Vorhersage der zu erwartenden spektroskopischen Daten aus den vorliegenden Konformationen ist in der Regel recht einfach. Das Ensemble hingegen aus spektroskopischen Daten zu ermitteln, ist deutlich schwieriger. Das Problem ist meistens unterdefiniert. Um eine Vorhersage über das Ensemble treffen zu können, ist eine Vielzahl von gemessenen Parametern erforderlich, was oft die Kombination komplementärer Methoden, wie beispielsweise NMR- und optischer Spektroskopie erfordert (GRAF, NGUYEN *et al.* 2007; HAGARMAN, MEASEY *et al.* 2010).

NMR-Spektroskopie besitzt die Möglichkeit, eine große Anzahl von Parametern zu sammeln, die Rückschlüsse auf das konformationelle Ensemble zulassen. Die gewonnenen Informationen haben außerdem atomare Auflösung, was die Bestimmung beispielsweise einzelner Winkel oder Abstände ermöglicht. Klassisch greift man bei der Strukturbestimmung von Proteinen oder Peptiden auf drei NMR-Parameter zurück:

1. Chemische Verschiebungen können direkt in Strukturinformation umgesetzt werden. Hierzu wird ein empirischer Zusammenhang zwischen Konformation und chemischer Verschiebung verwendet. Die Parametrisierung geschieht mit Hilfe von



Datenbanken. Die chemische Verschiebung erlaubt zum einen die Unterscheidung verschiedener Sekundärstrukturelemente (WISHART, SYKES *et al.* 1991; WISHART und NIP 1998; SHEN, DELAGLIO *et al.* 2009), zum anderen kann mittlerweile die dreidimensionale Struktur von gefalteten Peptiden oder kleinen Proteinen relativ genau auf Basis oder unter Zuhilfenahme von chemischen Verschiebungen bestimmt werden (SHEN, VERNON *et al.* 2009; ROBUSTELLI, KOHLHOFF *et al.* 2010).

2. Skalare Kopplungen können in Dihedralwinkel übersetzt werden. Hierzu können die gemessenen Kopplungskonstanten direkt mittels der Karplusgleichung in Rückgrat- oder Seitenkettenwinkel übersetzt werden. In der Regel werden mehrere Kopplungskonstanten benötigt, die denselben Winkel einschließen, um eine eindeutige Bestimmung zu ermöglichen (siehe Abbildung 1.2).
3. NOE-Distanzinformationen können benutzt werden um dreidimensionale Strukturen zu bestimmen. Für die Unterscheidung von Sekundärstrukturelementen ist eine qualitative Analyse der auftretenden NOE Kreuzsignale ausreichend. Die quantitative Analyse erlaubt die Messung von Abständen zwischen zwei Spins bis zu einem Abstand von etwa 5 Å (im Fall von Protonen), was bei einer ausreichend großen Anzahl an auftretenden NOE Kreuzsignalen die Bestimmung der Struktur ermöglicht.

Zusätzlich wird eine Reihe von Parametern verwendet, die erst kürzlich eingeführt wurden. Kreuzkorrelierte Relaxationsraten  $\Gamma^{\text{cc}}$  erlauben die Bestimmung des Projektionswinkels von zwei Bindungsvektoren (REIF, DIENER *et al.* 2000; SCHWALBE, CARLOMAGNO *et al.* 2001). Die Messung von *pseudo contact shifts* (PCS) (GOCHIN und RODER 1995; OTTING 2010), *paramagnetic relaxation enhancements* (PREs) (GILLESPIE und SHORTLE 1997b; GILLESPIE und SHORTLE 1997a; BOISBOUVIER, GANS *et al.* 1999) und dipolaren Restkopplungen (RDCs) (TOLMAN, FLANAGAN *et al.* 1995; TJANDRA und BAX 1997; BERNADO, BLANCHARD *et al.* 2005) erlaubt es, globale Orientierungen von Bindungsvektoren sowie langreichweitige Distanzen zu bestimmen. Heteronukleare Relaxationsraten ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_{1\rho}$ , hetNOE) dienen zur Bestimmung der Rotationskorrelationszeit  $\tau_c$  (LEE, RANCE *et al.* 1997), sowie der Bestimmung von lokalen Dynamiken auf der Zeitskala schneller als  $\tau_c$  (LIPARI und SZABO 1982a; LIPARI und SZABO 1982b). *Diffusion ordered spectroscopy* (DOSY) erlaubt es, den

hydrodynamischen Radius eines Moleküls und damit den Aggregationszustand zu bestimmen (CHEN, WU *et al.* 1995; WU und JOHNSON 1995).

Bei allen diesen Methoden ist zu beachten, dass sie im Falle von dynamischen Systemen, wie entfalteten Proteinen oder Peptiden, nur eine gemittelte Konformation beschreiben, wobei die Zeitskala der Mittelung vom jeweiligen Parameter abhängt (siehe Tabelle 1.1).

| NMR Parameter  | Strukturelle Information  | Zeitskala der Mittelung                                   |
|--|---|---|
| Chemische Verschiebung                                   | Sekundärstruktur  | $\mu\text{s} - \text{ms}$                                 |
| J Kopplung   | Torsionswinkel  | $\text{ms} - \text{s}$                                    |
| NOEs   | Abstände $< 5\text{\AA}$  | $\text{ps} - \text{ns}$<br>länger für Austausch           |
| Heteronukleare Relaxationsraten $R_1$ , $R_2$ und hetNOE | Rotationskorrelationszeit, lokale Dynamik, molekulare Anisotropie   | $\text{ps} - \text{ns}$<br>länger für Austausch ( $R_2$ ) |
| Dipolare Restkopplungen                                  | Orientierungen von Interspinvektoren relativ zum äußeren Magnetfeld | $\text{ms} - \text{s}$                                    |
| <i>Pseudocontact shifts</i>                              | Relative Orientierung und Entfernung zu einem paramagnetischen Kern | $\mu\text{s} - \text{ms}$                                 |
| <i>Paramagnetic relaxation enhancement</i>               | Entfernung zu einem paramagnetischen Kern                           | $\text{ps} - \text{ns}$                                   |
| Kreuzkorrelierte Relaxationsraten                        | Projektionswinkel zweier Bindungsvektoren                           | $\text{ms} - \text{s}$                                    |
| H/D Austausch  | Wasserstoffbrücken Stabilität (Sekundärstruktur)                    | $\text{s} - \text{Tage}$                                  |
| Diffusionskonstanten (DOSY Spektren)                     | Form und Aggregationszustand des Moleküls                           | Größenordnung der Diffusionszeit                          |

Tabelle 1.1 NMR Parameter sowie deren Strukturinformationen und die Zeitskala der konformationellen Mittelung.

Die Mittelung auf verschiedenen Zeitskalen hat allerdings auch Vorteile. So ist es möglich, die auftretenden Dynamiken durch den Vergleich verschiedener Parameter, wie z.B. RDCs und heteronuklearen Relaxationsraten, auf eine bestimmte Zeitskala einzugrenzen.

## 1.6 Konformationsbestimmung an RNA

Die Konformationsbestimmung an RNA mittels NMR-Spektroskopie gestaltet sich, verglichen mit Proteinen, als relativ schwierig. Zum einen ist die Protonendichte in RNA an sich geringer, was die Messung einer großen Anzahl von NOE-Signalen erschwert. Zum anderen ist eine sequenzielle Rückgratzuordnung für größere Moleküle nicht mehr möglich. Die einzelnen Bausteine sind durch das Phosphat-Zucker Rückgrat verbunden. Zwar ist Phosphor ein NMR-aktiver Kern, jedoch ist die Dispersion der Phosphor chemischen Verschiebung sehr gering. Dies führt im Fall von größeren Molekülen dazu, dass die einzelnen Resonanzen nicht mehr aufgelöst werden können. Außerdem sind die Phosphoratome nur über Sauerstoff mit den beiden verknüpften Zuckern verbunden, sodass man für eine Korrelation auf die kleineren  $^2J$  bzw.  $^3J(PC)$  Kopplungen zurückgreifen muss, wodurch die Experimente relativ unempfindlich werden. Erschwerend kommt außerdem hinzu, dass nicht wie im Fall von Proteinen nur zwei Winkel, sondern eine Vielzahl von Winkeln die Rückgratkonformation in RNA definiert (siehe Abbildung 1.12)

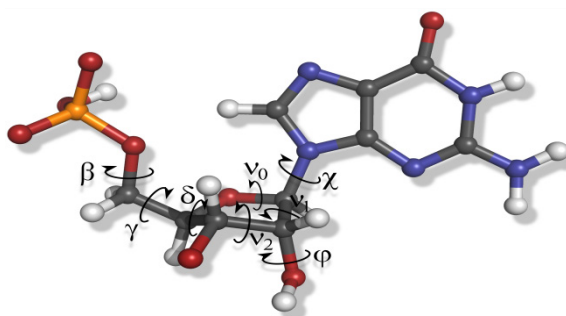


Abbildung 1.12 RNA Rückgratwinkel gezeigt für einen einzelnen RNA Baustein.

Die Bestimmung der Zuckerkonformation bedarf also einer Vielzahl von Experimenten. Üblicherweise werden Dipol-Dipol kreuzkorrelierte Relaxationsraten (RICHTER, GRIESINGER *et al.* 1999; SCHWALBE, CARLOMAGNO *et al.* 2001), Dipol-CSA kreuzkorrelierte Relaxationsraten (BOISBOUVIER, BRUTSCHER *et al.* 2000; SCHWALBE, RICHTER *et al.* 2000) sowie homonukleare (SCHWALBE, MARINO *et al.* 1995; MARINO, SCHWALBE *et al.* 1999) und heteronukleare (SCHWALBE, MARINO *et al.* 1994; SCHWALBE,

RICHTER *et al.* 1998) Kopplungskonstanten verwendet. Die chemische Verschiebung ist deutlich weniger aussagekräftig als in Proteinen.

Aufgrund der Verknüpfung durch den Ribose-Ring sind die zuckerassoziierten Winkel nicht komplett unabhängig, sondern können durch den Pseudorotationswinkel  $P$ , der auch als *sugar pucker* bezeichnet wird, ausgedrückt werden. Im Wesentlichen liegen zwei Konformationen vor, die C2' endo und die C3' endo Konformation.

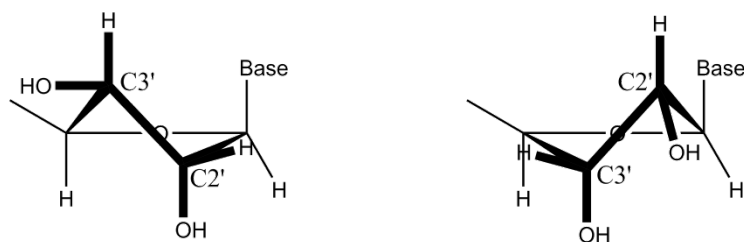


Abbildung 1.13 C3' endo Ribose-Konformation (links) und C2' endo Konformation (rechts).

Zusätzlich zur Zuckerkonformation bestehen unabhängig davon zwei Einstellmöglichkeiten für die Nukleobase relativ zum Zucker, syn und anti. Kürzlich publizierte Methoden erlauben eine Aussage über die Zuckerkonformation, die Nukleobasenorientierung und die Orientierung der 2' OH Gruppe auf Basis gemessener  $^1J_{CH}$  bzw.  $^2J_{CC}$  Kopplungskonstanten (NOZINOVIC, GUPTA *et al.* 2011).

## 1.7 Cylindramid und seine Derivate

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Strukturaufklärung des Moleküls Cylindramid und dem Vergleich mit vier verschiedenen Derivaten, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Bei Cylindramid handelt es sich um ein cytotoxisches Makrolactam (siehe Abbildung 1.14). Die Substanz kann aus *Halichondria cylindrata*, einer japanischen Schwammart isoliert werden (KANAZAWA, FUSETANI *et al.* 1993).

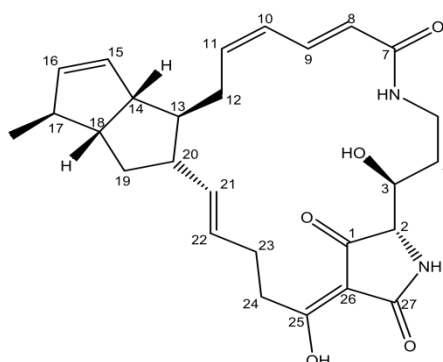


Abbildung 1.14 Strukturformel von Cylindramid.

Es besteht ein Interesse daran, Cylindramid und analoge Verbindungen synthetisch herzustellen, da diese nicht nur zytotoxisch sind, sondern eine gewisse Selektivität für Melanomzelllinien besitzen (CRAMER, LASCHAT *et al.* 2005). Diese Selektivität macht sie zu potentiellen Arzneimitteln.

Cylindramid selber wurde bereits chemisch synthetisiert und NMR-spektroskopisch untersucht (CRAMER, BUCHWEITZ *et al.* 2006; MATHIEU 2007). In dieser Arbeit werden außerdem vier Derivate untersucht (LASCHAT, CRAMER *et al.* 2008). Bei diesen sind die Positionen 13 und 20 nicht wie im Fall von Cylindramid über ein Pentalen-Ringsystem, sondern nur über einen Cyclopentan-Ring verknüpft (siehe Abbildung 1.15).

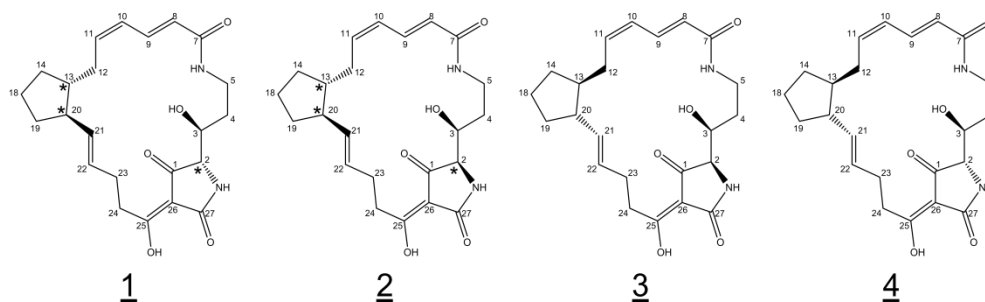


Abbildung 1.15 Cylindramid Derivate. Die mit einem Stern bezeichneten stereogenen Zentren sind unbestimmt.

Die Kenntnis der Struktur kleiner, biologisch aktiver Moleküle ist grundsätzlich eine Möglichkeit, um gezielt Modifikationen vornehmen zu können. Geht man davon aus, dass ein Zusammenhang besteht zwischen dreidimensionaler Struktur eines Moleküls und seiner Funktion (PATANI und LAVOIE 1996), so kann man ähnliche Moleküle entwerfen, die eine ähnliche Funktion haben.

Die Möglichkeit, strukturelle Eigenschaften gezielt der Funktion eines Moleküls zuordnen zu können, ist eine Fähigkeit der NMR-Spektroskopie, die bereits vorher erfolgreich eingesetzt wurde, um potentielle Liganden zu optimieren (SHUKER, HAJDUK *et al.* 1996).

## 2 Motivation

Die Messung von Kopplungskonstanten im Bereich Biomolekularer NMR-Spektroskopie hat vielseitige Einsatzmöglichkeiten. Zum einen kann allein die qualitative Analyse von bestimmten Kopplungen Aufschluss über die vorliegende Konformation bestimmter Teile des zu untersuchenden Moleküls geben. Zum anderen erlaubt die präzise Messung von Kopplungskonstanten die quantitative Analyse.

In der vorliegenden Arbeit sollen skalare Kopplungskonstanten von Modellpeptiden dazu benutzt werden, die individuellen Präferenzen, was die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen angeht, einzelner Aminosäuren zu untersuchen. Zu diesem Zweck werden 10 Modellpeptide der Sequenz GXG untersucht und die NMR-spektroskopischen Daten, in Verbindung mit komplementären Methoden, dazu verwendet, die Konformation zu bestimmen. Die Kenntnis der Präferenz bestimmter Aminosäuren, eine bestimmte Sekundärstruktur auszubilden, kann einerseits verwendet werden, um die Struktur bestimmter Proteinbereiche, außerhalb der bekannten Sekundärstrukturen zu verstehen. Andererseits kann die Kenntnis dieser individuellen konformationellen Präferenzen dazu benutzt werden, um Startpunkte der Proteinfaltung vorherzusagen.

Des Weiteren werden Methoden beschrieben, die die Messung von  $^1J$  Kopplungskonstanten an isotoopenmarkierter RNA ermöglichen. Hier besteht das Ziel darin, die zu messenden Kopplungskonstanten mit größtmöglicher Genauigkeit zu bestimmen, was zum Beispiel die Vorhersage der Zuckerkonformation oder Nukleobasenorientierung auf Basis der Kopplungen ermöglicht. Weitere Einsatzgebiete sind die Messungen von dipolaren Restkopplungen, die in der Regel entlang einer Bindung gemessen werden, sowie die Messung von Feldorientierung, wobei die beobachteten Unterschiede in der Regel sehr klein sind und daher hohe Präzision erfordern.

Ein drittes Augenmerk soll auf der chemischen und biochemischen Modifikation liegen, um die Messung von dipolaren Restkopplungen zu ermöglichen. Hier existiert für Proteine bereits ein breites Spektrum an Möglichkeiten. Die Möglichkeiten RNA auszurichten sind

allerdings bisher begrenzt. Es sollen Modifikationen entwickelt werden, die es ermöglichen, paramagnetische Zentren an RNA-Molekülen zu immobilisieren, um eine Ausrichtung im Magnetfeld zu erzwingen. Der Einsatz von paramagnetischen Kernen bietet zudem zusätzlich langreichweitige Distanzinformationen, was gerade im Fall von RNA aufgrund des Fehlens einer großen Anzahl von NOE-Signalen, der niedrigen Protonendichte wegen, in der Strukturbestimmung genutzt werden kann.

Als letzter Punkt wird eine Anwendung im Bereich kleiner Moleküle gezeigt. Hier wird eine Reihe von Derivaten eines bekannten Naturstoffes unter Zuhilfenahme von Kopplungskonstanten untersucht. Ein semiquantitativer Ansatz bei der Auswertung von DQF-COSY Spektren wird benutzt, um Strukturmerkmale zu identifizieren bzw. zu vergleichen.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Peptid Synthese

Sämtliche Peptide wurden mittels Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppen-Strategie synthetisiert (MERRIFIELD 1963; CARPINO und HAN 1972) (siehe Abbildung 3.1).

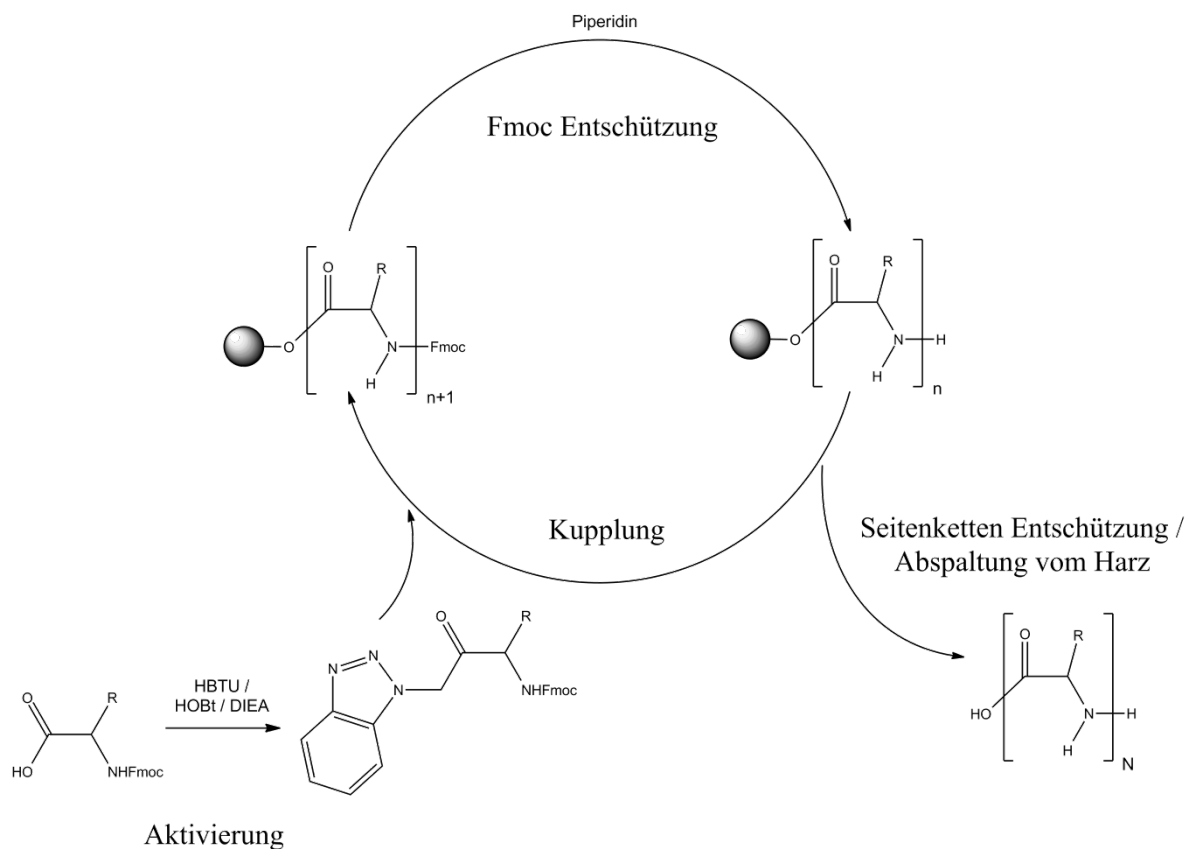


Abbildung 3.1 Schema der Fmoc-Festphasensynthese von Peptiden.

##### 3.1.1 Harzbeladung

In der Regel wird für die Festphasensynthese ein Harz als Träger verwendet, an das die C-terminale Aminosäure bereits gebunden ist. Im Fall von stabil isotopenmarkierten Aminosäuren sind diese Harze nicht kommerziell erhältlich. Aus diesem Grund wurde die Kupplung der ersten Aminosäure an Chlortritylharz manuell durchgeführt (siehe Abbildung 3.2).

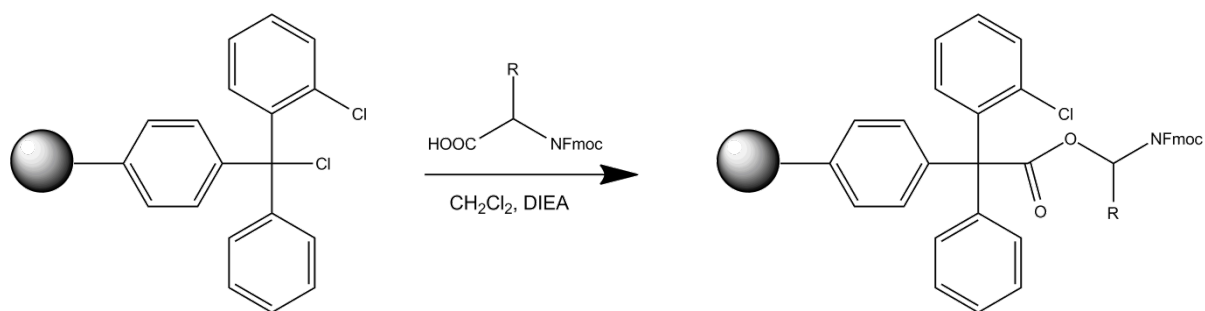


Abbildung 3.2 Kupplung der ersten Aminosäure and 2-Chlor-Tritylharz.

Für eine 20  $\mu$ Mol Synthese wurden 14,3 mg 2-Chlor-Tritylharz (1,4 mMol/g Novabiochem/Merck, Darmstadt) zum Quellen zweimal in je 5 mL Dichlormethan für 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurden 1,5 eq der N-Fmoc- bzw. N-Fmoc- und Seitenkettengeschützten Aminosäure (Eurisotop, München) und 3,75 eq DIEA in 2 mL Dichlormethan zugegeben und für 30 Minuten geschüttelt.

Zum Maskieren der verbliebenen, freien Chlortritylfunktionen wurden zweimal je 2 mL einer Mischung Dichlormethan/Methanol/DIEA (80:15:5) zugegeben und jeweils für 10 Minuten geschüttelt. Das Harz wurde anschließend mit dreimal je 5 mL Dichlormethan gewaschen und gefriergetrocknet.

### 3.1.2 Abspaltungen der Fmoc-Schutzgruppe

Zum Abspalten der Fmoc-Schutzgruppe wurde das Harz mit jeweils 5 mL 20% Piperidin in DMF, DMF, und erneut 20% Piperidin in DMF sowie anschließend zweimal mit 5 mL DMF gewaschen. Die Lösungen wurden zur UV-spektrometrischen Bestimmung der Kupplungseffizienz gesammelt.

### 3.1.3 Manuelle Kupplung

1,5 eq der zu kuppelnden, Fmoc-geschützten Aminosäure wurden zunächst durch Zugabe von 3,75 eq DIEA, 2 eq HOBT und 2 eq HBTU (bezogen auf die Menge eingesetzter Aminosäure) in 2 mL DMF aktiviert und dann zum Harz gegeben und für 45 Minuten geschüttelt. Das Harz wurde anschließend zweimal mit je 5 mL DMF für je 5 Minuten gewaschen.

### 3.1.4 Abspaltung vom Harz und Seitenkettenentschützung

Zur Abspaltung des synthetisierten Peptides und zur Entschützung der Seitenketten wurde das Harz zweimal für je 2 Stunden mit Entschützungslösung (hohe Konzentration an Trifluoressigsäure (TFA)) geschüttelt. Die gesammelten Lösungen wurden mit dem fünffachen Volumen Methyl-tert-butyl-ether (MTBE) präzipitiert und anschließend zweimal mit wenigen mL MTBE gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die verwendete Entschützungslösung richtete sich nach der Peptidzusammensetzung.

Für Peptide, die Cystein enthalten:      90% TFA, 5% H<sub>2</sub>O, 2.5% Thioanisol, 2.5% EDT

Ohne Seitenkettenschutzgruppen:      95% TFA, 5% H<sub>2</sub>O

Für alle anderen Peptide:                92.5% TFA, 5% H<sub>2</sub>O, 2.5% Triisopropylsilan

### 3.1.5 Automatisierte Peptidsynthese

Die automatisierte Peptidsynthese wurde an einem Applied Biosystems ABI 433A Peptid Synthesizer durchgeführt. Beladung des Harzes und die finale Abspaltung vom Harz wurden manuell vorgenommen (siehe 3.1.1 bzw. 3.1.4).

### 3.1.6 Aufreinigung der Peptide

Die synthetisierten Peptide wurden mittels Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) aufgereinigt. Zur Aufreinigung wurden RP-18 Säulen und Wasser / Acetonitril Laufmittelgradienten sowie 1% TFA verwendet. Die Analyse der aufgereinigten Peptide erfolgte mittels NMR Spektroskopie und Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS). Die aufgereinigten Peptide wurden anschließend bei -80 °C eingefroren und gefriergetrocknet.

### 3.1.7 NMR Probenpräparation

Die gefriergetrockneten Peptide wurden in Wasser (90 % H<sub>2</sub>O, 10% D<sub>2</sub>O, pH = 2) gelöst und in ein NMR-Probenröhrchen überführt.

## 3.2 In vitro RNA-Synthese

### 3.2.1 Gensynthese

Die Gene für die *in vitro* Transkription wurden aus kommerziell erhältlichen Primern und Templaten durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) hergestellt. Grundsätzlich wurde folgendes Design verwendet:

|       |             |             |                                 |       |
|-------|-------------|-------------|---------------------------------|-------|
| EcoRI | T7 Promotor | RNA Sequenz | HH-Ribozym / Restriktionsstelle | BamHI |
|-------|-------------|-------------|---------------------------------|-------|

Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Gens für die anschließende *in vitro* RNA Synthese. Hammerhead-Ribozym (HH) und die zusätzliche Restriktionsschnittstelle sind austauschbar.

Die Schnittstellen für die Enzyme EcoRI und BamHI dienen zum Klonieren des Konstrukts. Für Konstrukte ohne 3' Hammerhead-Ribozym wurde eine Restriktionsschnittstelle zum Linearisieren gewählt, die dem Ende der gewünschten RNA-Sequenz entspricht. Im Falle eines angehängten 3' Hammerhead-Ribozyms wurde die BamHI Schnittstelle ebenfalls zum Linearisieren des Plasmids nach der Klonierung benutzt.

Template und Primer wurden von der Firma MWG|Eurofins GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Desoxyribonukleotid-Triphosphate wurden von Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Polymerase und Reaktionspuffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

Für die Polymerase-Kettenreaktion im 50 µL Maßstab wurden folgende Bedingungen verwendet:

- Primer je 20 µg/L
- Templat 20 ng/L
- 10 mM Tris · HCl, pH = 8,3
- 50 mM KCl
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- dATP, dGTP, dCTP, dTTP je 2 mM
- Taq Polymerase 2,5 Einheiten

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95 °C, 90 s
2. Denaturierung bei 95 °C, 30 s
3. *Annealing* bei 55 °C, 30 s
4. DNA-Strang Verlängerung bei 72 °C, 15 s
5. Verlängerung unvollständiger Stränge 72 °C, 120 s

Die Punkte zweitens bis viertens wurden jeweils 30mal wiederholt. Anschließend wurde die PCR Reaktion bis zur Aufreinigung auf 4 °C abgekühlt. Die Aufreinigung erfolgte mittels eines *PCR Purification Kits* (Quiagen, Hilden, Deutschland) bzw. für sehr kurze Konstrukte mittels eines *Nucleotide Removal Kits* (Quiagen). Das aufgereinigte Gen wurde im letzten Schritt der Aufreinigung mit 50 µL dH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.2.2 Klonierung

Die synthetisierten DNA-Gene wurden zur Amplifikation und Sequenzierung in einen pUC19 DNA-Vektor (Invitrogen, Paisley, UK) kloniert. Gen und Vektor wurden zunächst mit EcoRI und BamHI (New England Biolabs) vierfach überverdaut. Das Gen wurde anschließend über ein *PCR Purification Kit* bzw. ein *Nucleotide Removal Kit* aufgereinigt. Der linearisierte Vektor wurde nach präparativer Agarosegelelektrophorese über ein *Gel Extraction Kit* (Quiagen) aufgereinigt.

Linearisierter Vektor und verdautes Gen wurden danach ligiert. Für die Ligation wurden Quick Ligase und Ligationspuffer der Firma New England Biolabs verwendet. Vektor und DNA-Fragment wurden dabei im molaren Verhältnis von 1 zu 4 in einem 20 µL Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur ligiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend auf 4 °C abgekühlt.

### 3.2.3 Transformation

Für die Transformation wurden E.Coli DH5α *super competent* Zellen (Invitrogen) verwendet.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und zu 25 µL der Zellen wurden 5 µL Ligationsansatz gegeben. Die Mischung wurde 30 Minuten bei 0 °C belassen und anschließend einem 42 °C Hitzeschock für 45 Sekunden unterzogen. Nach erneutem Abkühlen auf Eis wurden 100 µL S.O.C. Medium (Invitrogen) hinzugefügt und 2 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten, die 0,1 mg/mL Ampicillin enthalten, ausplattiert und für 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden 24 Stunden in 5 mL LB-Medium (0,1 mg/mL Ampicillin) inkubiert und danach wurde die plasmidische DNA mit Hilfe von Plasmid MiniPrep Kits (Quiagen) isoliert und sequenziert (GATC Biotech, Konstanz).

### 3.2.4 DNA-Vervielfältigung

Isolierte und sequenzierte DNA wurde erneut, wie unter 3.2.3 beschrieben, in E.Coli DH5 $\alpha$  Zellen transformiert und auf einer LB-Agarplatte (0,1 mg/mL Ampicillin) ausplattiert.

Nach Inkubation für 12 Stunden bei 37 °C wurde eine einzelne Kolonie in eine 50 mL Vorkultur (LB Medium + 0,1 mg/mL Ampicillin) überführt und bis zum Auftreten einer sichtbaren Trübung bei 37 °C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 6000 g für 5 Minuten pelletiert danach mit LB-Medium gewaschen und anschließend mit LB Medium in eine 1 L Kultur (LB-Medium + 0,1 mg/mL Ampicillin) überführt.

Nach Inkubation für weitere 12 Stunden bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 6000 g für 20 Minuten pelletiert und anschließend die plasmidische DNA mittels eines Plasmid MegaPrep Kits (Quiagen) isoliert.

### 3.2.5 DNA-Verdau

Um den Abbruch der *in vitro* Transkription an der gewünschten Stelle zu gewährleisten, wurde die isolierte Plasmid DNA durch Restriktionsverdau linearisiert.

10 mg isolierte DNA wurden hierzu in einem 10 mL Ansatz für 16 Stunden verdaut. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die Menge Restriktionsenzym zugegeben, die für einen 1,5fachen Überverdau der DNA ausreicht. Der vollständige Verdau wurde durch analytische Agarosegelelektrophorese überprüft.

Zur Aufreinigung wurde eine Chloroform/Phenol-Extraktion durchgeführt. Der Restriktionsverdau wurde dreimal mit je 5 mL RotiPhenol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Die wässrige Phase wurde anschließend dreimal mit je 10 mL Chloroform gewaschen und die DNA mit dem 2,5fachen Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (45 Minuten bei 10000 g) pelletiert. Das DNA-Pellet wurde mit wenig 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die endgültige DNA Konzentration wurde photometrisch bestimmt.



### 3.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Bestimmung der Länge von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Elektrophorese durch ein Agarose-Gel.

Je nach Länge der zu untersuchenden DNA wurden Gele mit einer Agarose-Konzentration zwischen 0,8 und 2 Gewichtsprozent verwendet. Agarose wurde in TAE Puffer (40 mM Tris / Acetat pH = 7,5, 1 mM EDTA) suspendiert, zum Kochen erhitzt, durchmischt und anschließend gegossen.

Die DNA wurde zum Auftragen auf das Gel mit 20 % Probenpuffer versetzt (50 % Glycerin, 0,1 % Bromphenol-blau, 0,1 % Xylencyanol FF). Als Laufpuffer wurde TAE Puffer verwendet. Die Gele wurden mit einer konstanten Spannung von 120 V betrieben.

Die Gele wurden mit einer Lösung von 0.5 mg/L Ethidiumbromid in Wasser für 20 Minuten gefärbt. Die DNA-Banden konnten danach durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden. Als Vergleich für Größe und Konzentration der zu untersuchenden DNA wurde je nach Größe *2-log ladder* (NewEngland Biolabs) oder *PCR Marker* (NewEngland Biolabs) verwendet.

### 3.2.7 Optimierung der RNA *in vitro* Transkriptionsbedingungen

Für die *in vitro* Transkription wurden zunächst folgende Bedingungen in 50 µL Testtranskriptionen optimiert:

- Magnesiumkonzentration
- rNTP Konzentration
- DNA Konzentration

Die Analyse der Testtranskriptionen erfolgte mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und HPLC. Die Magnesiumkonzentration wurde im Bereich von 5 bis 40 mM,

die DNA-Konzentration im Bereich von 40 bis 200 nM und die gesamt rNTP Konzentration im Bereich von 5 bis 20 mM optimiert. Die Zusammensetzung der rNTPs wurde der Zusammensetzung der zu transkribierenden RNA Sequenz angepasst.

Zusammen mit den festen Bestandteilen der Transkription ergeben sich daraus folgende Bedingungen für die Testtranskriptionen:

| Variable Bedingungen   |             |
|------------------------|-------------|
| Magnesiumacetat        | 5 – 40 mM   |
| DNA Templat            | 40 – 200 nM |
| rNTPs                  | 5 – 20 mM   |
| Feste Bedingungen      |             |
| Tris / Acetat pH = 8,1 | 200 mM      |
| DTT                    | 20 mM       |
| Spermidin              | 2 mM        |
| T7 Polymerase          | 0,1 mg/mL   |

Tabelle 3.1 Bedingungen für die *in vitro* RNA Synthese.

Die Transkriptionen wurden bei 37 °C für 2 Stunden durchgeführt. Bei Konstrukten mit 5' Hammerhead-Ribozym wurde die Magnesiumkonzentration zu Testzwecken nach Beendigung der Transkription auf 60 mM eingestellt und der Transkriptionsansatz erneut 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.8 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Analyse von synthetisierter RNA wurde denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet. Als Gel wurde Polyacrylamid / Bisacrylamid (37.5 : 1) mit einer Konzentration je nach RNA-Größe zwischen 12 und 20 % verwendet. Das Gel enthielt außerdem 7 M Harnstoff und eine einfache Konzentration an TBE Puffer ( 89 mM TRIS, 89 mM Borat, 2 mM EDTA, pH = 8). Zum Auftragen der Probe wurde diese im Verhältnis 2 : 1 mit Probenpuffer (99,8 % Formamid, 0,1 % Bromphenol-

blau, 0,1 % Xylencyanol FF) gemischt und anschließend 10 Minuten bei 95 °C denaturiert.

Die Gele wurden mit einer konstanten Stromstärke von 45 mA betrieben. Sie wurden mit einer Lösung von 0.5 mg/L Ethidiumbromid in Wasser für 15 Minuten gefärbt, die RNA Banden konnten danach durch UV-Licht mit einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 3.4).

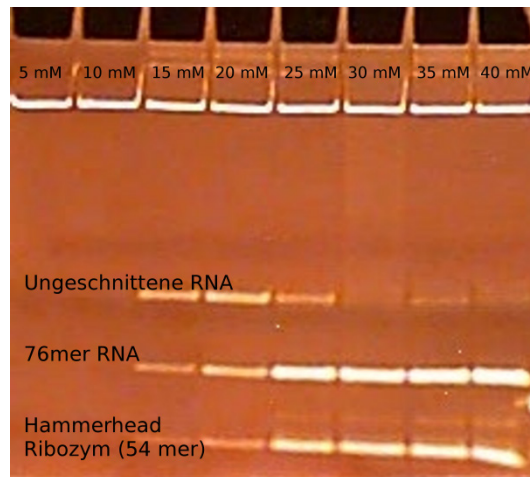


Abbildung 3.4 Denaturierendes Polyacrylamidgel einer Reihe von Testtranskriptionen zur Optimierung der Magnesiumkonzentration.

### 3.2.9 RNA *in vitro* Transkription

Die optimierten Bedingungen wurden für einen 25 mL Ansatz verwendet. Die Transkription wurde für maximal 5 Stunden durchgeführt. Während der Transkription wurde die Ausbeute mittels HPLC kontrolliert und bei nicht mehr steigender Ausbeute gegebenenfalls früher gestoppt. Bei Transkriptionen mit geringer Ausbeute wurden nach 90 Minuten zusätzlich 0,05 mg/mL Polymerase und 10 mM DTT zugegeben. Die Transkription wurde durch Abkühlen auf 4°C gestoppt. Bei der Reaktion anfallendes Magnesiumpyrophosphat wurde durch Zentrifugation entfernt, der Überstand wurde anschließend durch präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgereinigt.

### 3.2.10 Präparative Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Der Transkriptionsansatz wurde zunächst einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen (siehe 3.2.5).

Nach dem Fällern der RNA wurde diese in 1 mL ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei 95°C denaturiert. Anschließend wurden 0.5 mL Probenpuffer für die denaturierende Gelelektrophorese zugegeben. Die Probe wurde anschließend auf ein 2mm dickes Gel aufgetragen wobei Größe und Polyacrylamid-Konzentration je nach Trennproblem und RNA-Länge variiert wurden.

Die RNA-Banden wurden anschließend durch *UV shadowing* sichtbar gemacht (siehe Abbildung 3.5). Hierzu wurde das Gel auf einer Platte mit Fluoreszenzindikator (254 nm) platziert und mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm belichtet. Die RNA-Banden erscheinen hierbei als dunkle Schatten und konnten direkt ausgeschnitten werden. Die Gelbanden wurden in je 50 mL Natriumacetatpuffer (0.75 M pH = 5.5) für 72 Stunden bei 4°C geschüttelt. Die Lösung wurde durch Sterilfilter gepresst, um eventuelle feste Gelrückstände zu entfernen. Anschließend wurde die RNA mit dem 2,5fachen Volumen Ethanol präzipitiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, erneut in wenig Wasser aufgenommen und mit dem 5fachen Volumen 2% Lithiumperchlorat in Aceton präzipitiert. Das Pellet der Lithiumperchloratfällung wurde mit wenig 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend luftgetrocknet.

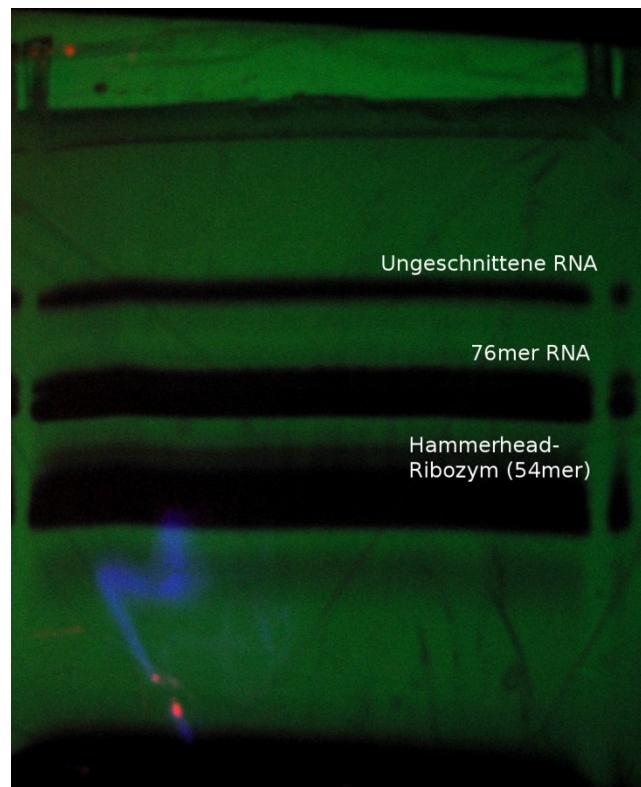


Abbildung 3.5 Präparatives Polyacrylamidgel (13%) zur Aufreinigung einer transkribierten 76mer RNA mit Hammerhead-Ribozym am 3' Ende, sichtbar gemacht mittels UV shadowing.

### 3.2.11 RNA-Faltung

Da es sich bei allen untersuchten RNA-Konstrukten um einfache Monomere handelt, was ihre Sekundärstruktur angeht (z.B. weisen sie keine Pseudoknoten auf), konnten alle nach demselben Schema gefaltet werden.

Die aufgereinigte RNA wurde in 1 mL ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf 95 °C erwärmt. Die RNA wurde dann möglichst schnell in das zehnfache Volumen ddH<sub>2</sub>O injiziert, welches vorher auf 0 °C gekühlt worden war. Die gewonnene Lösung wurde bei -80 °C eingefroren und anschließend gefriergetrocknet.

### 3.2.12 NMR-Probenpräparation

Die getrocknete RNA wurde in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und anschließend wurden 0,1 Volumen 10x RNA Puffer zugegeben (150 mM MES, 500 mM KCl, pH = 6,5 in D<sub>2</sub>O). Die Probe wurde anschließend in das zuvor mit DEPC behandelte NMR Probenröhrchen überführt.

Zur Herstellung von Proben in D<sub>2</sub>O wurde die zuvor genannte Probe eingefroren, gefriergetrocknet und D<sub>2</sub>O (99,98 Atomprozent Deuterium) zugegeben. Der Vorgang wurde wiederholt, um einen annähernd vollständigen Austausch von Wasserstoff zu Deuterium zu gewährleisten.

### 3.2.13 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

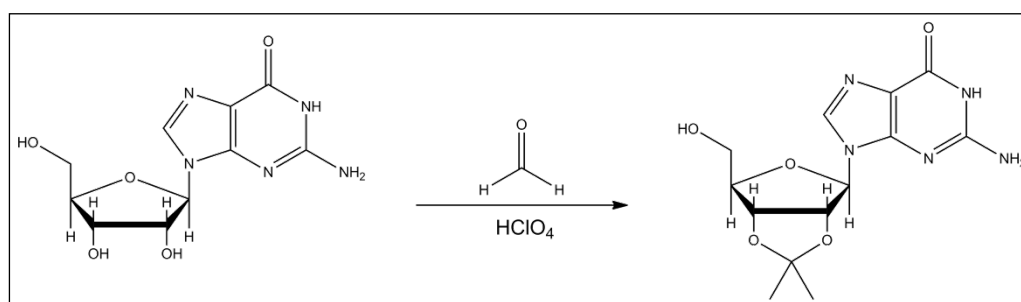
Für die native Gelelektrophorese wurden Gele mit einer Konzentration zwischen 10 und 15 % verwendet, die eine einfache Konzentration an TA Puffer enthalten (50 mM Tris-Acetat, 100mM Natriumacetat, pH = 8,1).

0,1 OD der zu untersuchenden RNA wurde mit 0,2 Volumen Probenpuffer (99,8 % Glycerin, 0,1 % Bromphenol-blau, 0,1 % Xylencyanol FF) vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer diente ebenfalls TA Puffer. Die Gele wurden unter ständiger Wasserkühlung mit einer konstanten Leistung von maximal 3 Watt betrieben.

### 3.3 Synthese von Guanosinmonothiophosphat

Die Synthese wurde nach der literaturbekannten Methode von Behrman durchgeführt (BEHRMAN 2000), lediglich in einem größeren Maßstab um den Einsatz in der *in vitro* Transkription im Maßstab der NMR Probenpräparation zu ermöglichen.

#### 3.3.1 Synthese von 2',3'-Isopropyliden-Guanosin **1**

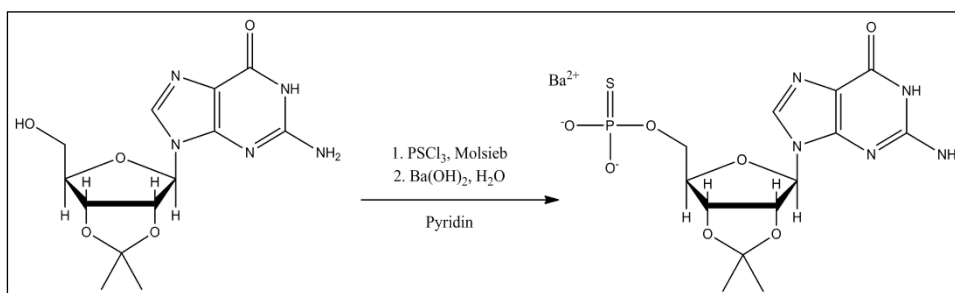


10 g Guanosin (35,5 mmol) wurden in 400 mL trockenem Aceton suspendiert. Anschließend wurden 3 mL Perchlorsäure (70 %) zugegeben und bei Raumtemperatur gerührt. Die Lösung klarte innerhalb von 30 Minuten auf und wurde für weitere 2 Stunden gerührt.

Das Lösungsmittel wurde am Rotationverdampfer entfernt und der weiße Rückstand aus Wasser / Ethanol umkristallisiert. Die Ausbeute betrug 89 % (10,2 g).

$^1\text{H}$  NMR, 400 MHz,  $\delta$  (DMSO- $d_6$ ): 1,32 (s, 3H), 1,52 (s, 3H), 3,53 (m, 2H), 4,12 (m, 1H), 4,97 (dd, 1H,  $J = 2,9$  Hz, 6,2 Hz), 5,05 (t, 1H,  $J = 6,2$  Hz), 6,19 (dd, 1H,  $J = 2,9$  Hz, 6,2 Hz), 5,92 (d, 1H,  $J = 2,9$  Hz), 6,50 (s, 2H), 7,91 (s, 1H), 10,64 (bs, 1H).

### 3.3.2 Synthese von 2',3'-Isopropyliden-Guanosinmonothiophosphat Bariumsalz **2**



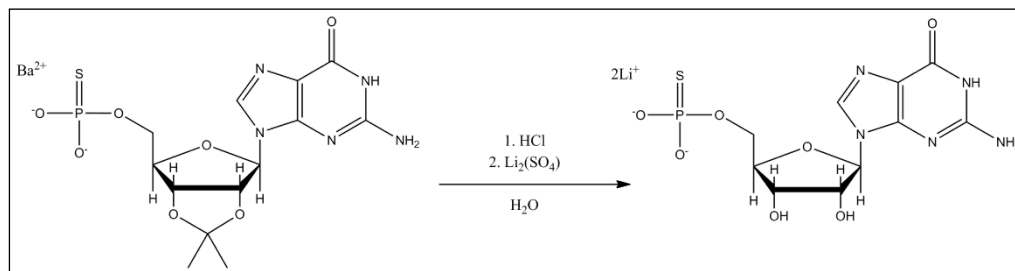
1,6 g 2',3'-Isopropyliden-Guanosin (**1**) (5 mmol) wurden in 30 mL trockenem Pyridin suspendiert. Zu der Suspension wurden 2,5 g Molsieb (3 Å) gegeben und sie wurde auf 0 °C im Eisbad abgekühlt. Unter Rühren wurden 2 mL  $\text{PSCl}_3$  (20 mmol) langsam zugegeben. Nach beendeter Zugabe wurde 30 Minuten bei 0° C gerührt und anschließend eine Mischung von 8 g  $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8 \text{H}_2\text{O}$  (25 mmol) und 40 g Eis zugegeben. Nachdem das Eis vollständig geschmolzen war, wurde der angefallene Niederschlag durch Zentrifugation entfernt.

Zum Überstand wurden 2,5 Volumen Ethanol zugegeben, der entstehende Niederschlag durch Zentrifugation gesammelt und anschließend zweimal mit 95%igem Ethanol gewaschen. Nach Waschen des Produktes mit Aceton und Trocknen betrug die Ausbeute 45 % (1,25 g).

Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung direkt umgesetzt.



### 3.3.3 Synthese von Guanosinmonothiophosphat Lithiumsalz **3**



1,25g 2',3'-Isopropyliden-Guanosinmonothiophosphat Bariumsalz (**3**) (2,25 mmol) wurden in 50 mL 0,4 M Salzsäure gelöst und für 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert der Lösung wurde mit konzentriertem Ammoniak auf pH = 6,5 eingestellt. Die einsetzende Präzipitation wurde durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol vervollständigt und der Niederschlag durch Zentrifugation gesammelt.

Das Pellet wurde zweimal mit 95%igem Ethanol und einmal mit Aceton gewaschen und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde nun in 30 mL Wasser gelöst und 24,8 mg Lithiumsulfat (2,25 mmol) zugegeben. Nach einer Stunde Rühren wurde der Niederschlag durch Zentrifugation entfernt und der Überstand mit 5 Volumen Aceton gefällt. Die Ausbeute nach dem Trocknen betrug 50% (440 mg).

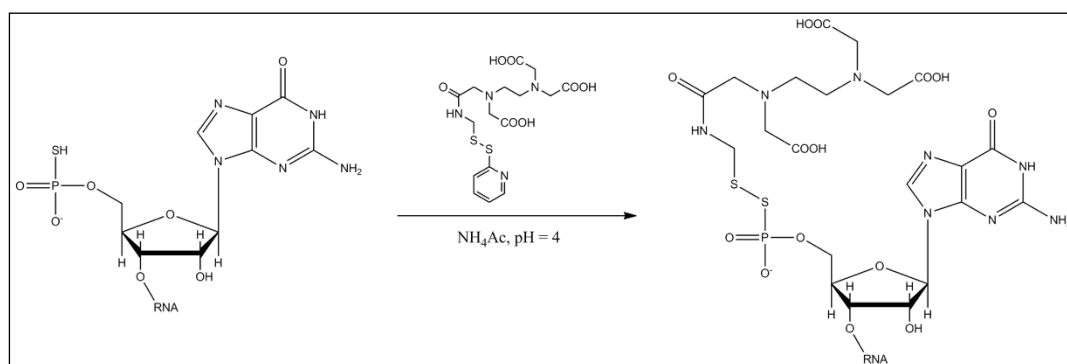
$^{31}\text{P}$  NMR, 121 MHz,  $\delta$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ): 43.1 (td,  $J = 5,9 \text{ Hz}, 1,3 \text{ Hz}$ ).

### 3.4 Transkription und Modifikation von 5'-Monothiophosphat RNA

#### 3.4.1 *In vitro* Transkription von 5'-Monothiophosphat RNA

Die Optimierung, Transkription und Aufreinigung der RNA wurde, wie unter 3.2 beschrieben, durchgeführt. Zur Transkription wurde ein fünffacher Überschuss an Guanosinmonothiophosphat bezogen auf Guanosintriphosphat zugegeben. Nach der Aufreinigung wurde die RNA in Ammoniumacetatpuffer (50 mM Ammoniumacetat, pH = 4) gelöst (WU, EDER *et al.* 2001).

#### 3.4.2 Kupplung eines Chelators an 5'-Monothiophosphat RNA



Zu der RNA, gelöst bei pH = 4, wurde ein 20facher Überschuss an N-[S-(2-Pyridylthio)cysteaminyl]ethylenediamin-N,N,N',N'-tetraacetat (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada) zugegeben. Die Reaktion wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die RNA wurde danach durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol präzipitiert und anschließend zweimal mit Aceton und 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde nun, wie unter 3.2.11 beschrieben gefaltet, und für die NMR spektroskopische Untersuchung vorbereitet. Die Reaktion kann mittels  $^{31}\text{P}$  NMR verfolgt werden, da die Ausbildung der Disulfidbrücke zu einer etwa 25 ppm starken Verschiebung ins Hochfeld führt (BEHRMAN 2000).

## 4 Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Bestimmung von Kopplungskonstanten an Tripeptiden

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde eine Serie von zehn Modellpeptiden untersucht.

Diese Peptide wurden hierzu isotoopenmarkiert synthetisiert und NMR-spektroskopisch untersucht. Bei diesen Tripeptiden handelt es sich um GXG-Peptide. Deren Sequenz ermöglicht es, die strukturellen Eigenschaften der Aminosäure X ohne besonderen Kontext zu untersuchen. Glycin wurde hierbei als benachbarte Aminosäure verwendet, um die Wechselwirkung der Aminosäure X mit den beiden benachbarten Aminosäuren zu minimieren.

Um die Aminosäure X vollständig NMR spektroskopisch untersuchen zu können, wurde diese  $^{13}\text{C}$  sowie  $^{15}\text{N}$  markiert eingesetzt. Um auch die Kopplungskonstanten messen zu können die Rückgratátome der Aminosäuren G1 und G3 involvieren, wurde G1  $^{13}\text{C}'$  und G3  $^{15}\text{N}$  markiert in der Synthese eingesetzt. Bei der Untersuchung wurden X = A, V, F, S, E, L, D, N, C und T verwendet.

#### 4.1.1 Zuordnung der GXG-Peptide

Alle Zuordnungsexperimente wurden entweder bei 400 MHz an einem Bruker Avance II Spektrometer mit HCN Trippelresonanz Probenkopf mit z-Gradienten, oder bei 600 MHz an einem Bruker DRX Spektrometer mit HCN Trippelresonanz Probenkopf mit xyz-Gradienten durchgeführt. Die Messzeit für die gezeigten Experimente betrug pro Peptid weniger als 60 Minuten.

Um die Rückgratwinkel bestimmen zu können, ist eine vollständige Zuordnung der Rückgratátome notwendig. Im Fall von GXG-Peptiden kann man die Rückgrat  $\text{H}^{\text{N}}$  Signale direkt zuordnen. Das N-terminale G1 besitzt kein Amidproton. Die Amidprotonen von X2 und G3 können direkt anhand der Multiplizität unterschieden werden: X2 besitzt nur ein

koppelndes  $H^{\alpha}$  Atom und zeigt daher ein Dublett, G3 aufgrund der zwei koppelnden  $H^{\alpha}$  Protonen ein Triplet (siehe Abbildung 4.1).

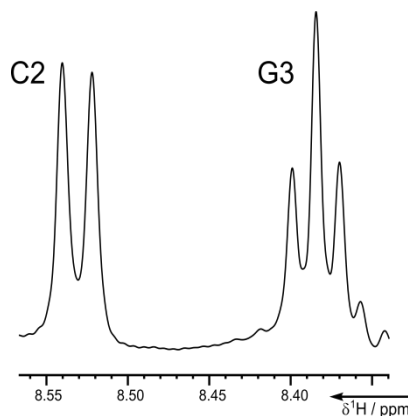


Abbildung 4.1 Ausschnitt des Protonen 1D Spektrums von GCG. Die beiden Amidprotonen zeigen ein Dublett im Fall von C2 bzw. ein Triplet für G3.

Alle weiteren Zuordnungen konnten auf Basis der Protonenzuordnung getroffen werden.

Die Zuordnung der Stickstoff-Resonanzen wurde durch ein 2D  $^{15}\text{N}$ -HSQC Experiment (MORI, ABEYGUNAWARDANA *et al.* 1995) durchgeführt (siehe Abbildung 4.2).

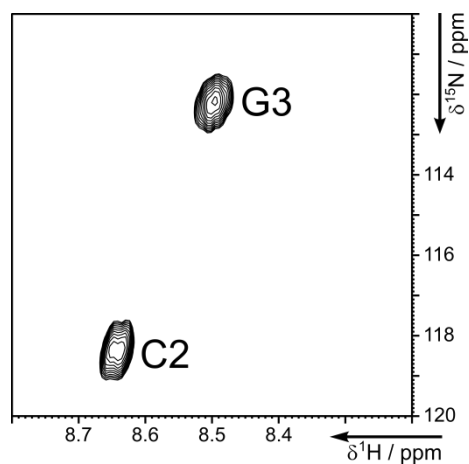


Abbildung 4.2  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum von GCG. Mit Hilfe der bereits vorhandenen Protonenzuordnung können die  $^{15}\text{N}$  chemischen Verschiebungen direkt zugeordnet werden.

Die Zuordnung der Carbonyl-Kohlenstoffe erfolgte durch ein 2D H(N)CO Experiment (GRZESIEK und BAX 1992). Hierbei werden die Amidprotonen des Rückgrats jeweils mit dem Carbonyl-Kohlenstoffatom der vorhergehenden Aminosäure korreliert.

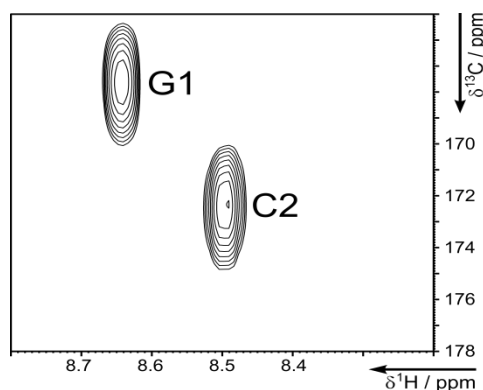


Abbildung 4.3 2D H(N)CO Spektrum von GCG. Das mit G1 bezeichnete Signal zeigt in der Protonendimension die chemische Verschiebung von C2 und in der Kohlenstoffdimension die Carbonyl chemische Verschiebung von G1. Analog gilt dies für das zweite Signal (G3 H<sup>N</sup> – C2 C').

Die chemische Verschiebung der C<sup>α</sup> Atome wurde mit Hilfe eines 2D H(N)CA Experiments zugeordnet (GRZESIEK und BAX 1992). Bei diesem Experiment sieht man grundsätzlich, ausgehend von einem Amidproton, zwei C<sup>α</sup> Signale, das der gleichen und das der vorhergehenden Aminosäure. Aufgrund des Markierungsschemas erkennt man für die untersuchten Tripeptide nur zwei Signale, jeweils zum C<sup>α</sup> der Aminosäure X, ausgehend von den Amidprotonen der Aminosäuren X2 und G3 (siehe Abbildung 4.4).

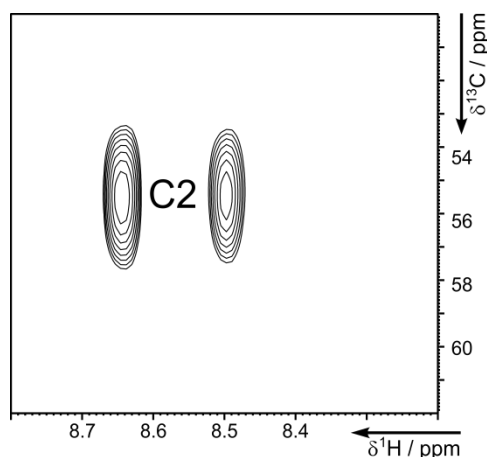


Abbildung 4.4 2D H(N)CA Spektrum von GCG. Beide Amidprotonen zeigen aufgrund des Markierungsschemas nur die Korrelation zum  $C^\alpha$  Atom der Aminosäure C2.

Die genannten Methoden konnten in allen Fällen benutzt werden, um eine vollständige Zuordnung der isotopenmarkierten Rückgratmate zu erhalten.

Die Experimente zur Bestimmung der Kopplungskonstanten ermöglichen zwar teilweise ebenfalls die Zuordnung, jedoch ist die Kenntnis der chemischen Verschiebungen Voraussetzung, um diese Experimente präzise durchführen zu können, da sie in der Regel die selektive Entkopplung von  $C^\alpha$  und / oder  $C'$  erfordern.

#### 4.1.2 Messung der Kopplungskonstanten für die Serie von GXG-Peptiden

Für die untersuchten Peptide wurden jeweils sechs Kopplungskonstanten bestimmt, vier  $\phi$ -abhängige und zwei  $\psi$ -abhängige Kopplungen. Alle Messungen wurden in 90%  $H_2O$  / 10%  $D_2O$ , pH = 2 durchgeführt. Die Messungen wurden entweder bei 400 MHz an einem Bruker Avance II Spektrometer mit HCN Trippelresonanz Probenkopf mit z-Gradienten, oder bei 600 MHz an einem Bruker DRX Spektrometer mit HCN Trippelresonanz Probenkopf mit xyz-Gradienten durchgeführt. Die Experimente zur Bestimmung der sechs Kopplungskonstanten benötigten 48 Stunden je Peptid.

Um die  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$  Kopplung zu bestimmen, wurde ein  $^{13}\text{C}$ -entkoppeltes 1D-Spektrum aufgenommen. Als Einstrahlungsfrequenz wurde die Mitte der zuvor bestimmten  $\text{C}^{\alpha}$  und  $\text{C}'$  chemischen Verschiebungen gewählt. Die Signalpositionen wurden durch Dekonvolution der gemessenen Spektren extrahiert (siehe Abbildung 4.5).

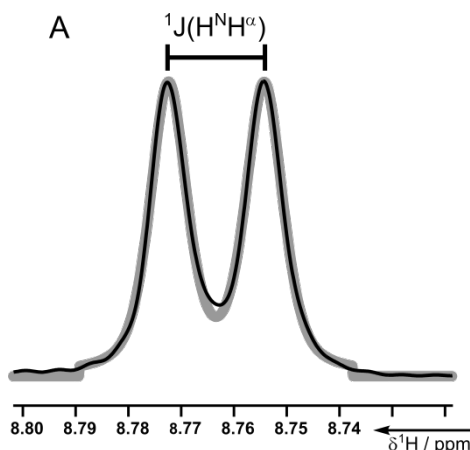


Abbildung 4.5 1D-Spektrum von GCG. Gezeigt ist das Signal der Amidprotons von C2. In grau hinterlegt ist das Deconvolutions Ergebnis.

Die Entkopplung nur der Kohlenstoffe hat gegenüber der gleichzeitigen Entkopplung von Kohlenstoff und Stickstoff den Vorteil, dass aufgrund der geringeren eingestrahnten Leistung mehr Punkte digitalisiert werden und dadurch eine höhere Auflösung erzielt werden kann. Die Entkopplung der Stickstoff-Kerne ist nicht nötig, da die  $^1J(\text{NH})$  Kopplung vollständig aufgelöst werden kann ( $\sim 92 \text{ Hz}$ ). Außerdem variiert die  $^1J(\text{NH})$  Kopplung kaum, so dass sie nicht zu Signalüberlapp führt, da sie für beide beobachteten Amidprotonen gleichermaßen zu einer Aufspaltung führt.

Die  $^1J$  bzw.  $^2J(\text{NC}^{\alpha})$  Kopplungen wurden in einem J-modulierten  $^{15}\text{N}$ -HSQC Experiment bestimmt (WIRMER und SCHWALBE 2002). Hierbei wurden jeweils 16 zweidimensionale Ebenen mit verschiedenen Mischzeiten (0 - 250 ms) für die Evolution der Kopplung aufgenommen. Der Intensitätsverlauf folgt beim Auftreten von nur einer Kopplung der Gleichung

$$I(\tau) = I_0 \cos(\pi^n J_{\text{NC}^{\alpha}} \tau) e^{-\frac{\tau}{T_2^*}} \quad (4.1)$$

Die Analyse des Intensitätsverlaufes wurde mit dem Programm SigmaPlot durchgeführt. Hierzu wurden die Intensitäten für die zwei auftretenden Signale der 16 Ebenen extrahiert und in einer Ausgleichsrechnung verwendet, um die Parameter  $I_0$ ,  $^1J$  bzw.  $^2J(NC^\alpha)$  und  $T_2^*$  (die Relaxationsrate des Operators  $2H_zN_{x/y}$ ) zu bestimmen (siehe Abbildung 4.6).

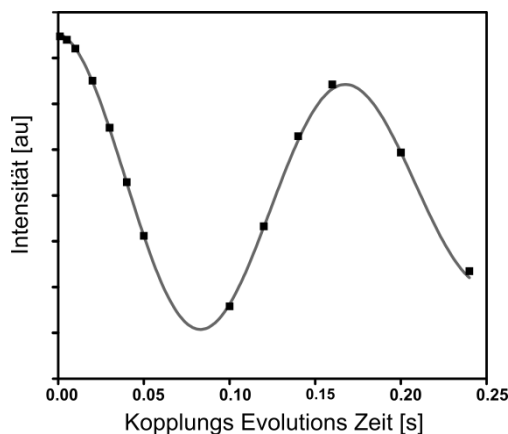


Abbildung 4.6 Intensitätsverlauf des J-modulierten  $^{15}\text{N}$ -HSQCs zur Bestimmung der  $^1J(NC^\alpha)$  Kopplungskonstante, gezeigt für das Signal C2 in GCG. Die gemessenen Datenpunkte sind in schwarz gezeigt, die Ausgleichsfunktion in grau hinterlegt.

Für uniform markierte Peptide beobachtet man, wie in Abbildung 1.11 gezeigt, zwei verschiedene Kopplungen, ausgehend vom Stickstoff, zum  $C^\alpha$  Atom der gleichen und der vorhergehenden Aminosäure. Aufgrund des Markierungsschemas tritt für die untersuchten GXG-Peptide jeweils nur eine Kopplung zum markierten  $C^\alpha$  Atom der Aminosäure X auf.

Die  $^3J(H^NC^\alpha)$  Kopplung wurde mit Hilfe eines 2D  $H(N)CO[Ca]$ -E.COSY gemessen (SCHWALBE, HENNIG *et al.* 2000). Hierbei wird die  $^1J(C^\alpha C')$  Kopplung als passive Kopplung benutzt, um die zu messende Kopplung auflösen zu können (siehe Abbildung 4.7).



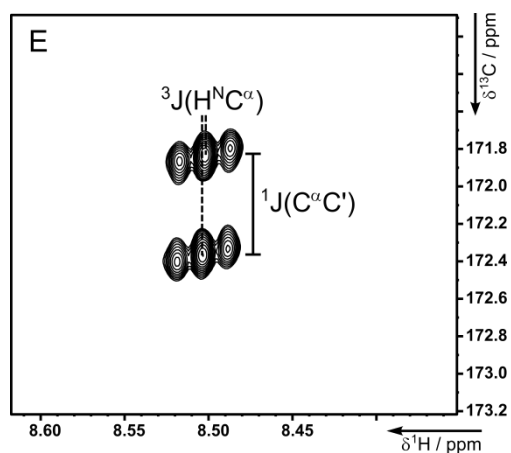


Abbildung 4.7 2D  $H(N)CO[Ca]$ -E.COSY gemessen an GCG. Die Signale sind in der direkten Dimension mit der zu messenden  ${}^3J(H^N C^\alpha)$  Kopplung verschoben und in der indirekten Dimension mit der passiven  ${}^1J(C^\alpha C')$  Kopplung aufgespalten.

Die Auswertung der Kopplung erfolgte für das durchgeführte Experiment durch Verschieben der beiden Signale bis zur Minimierung des Differenz-Integrals. Hierzu wurden die beiden Zeilen maximaler Intensität extrahiert und gegeneinander verschoben (siehe Abbildung 4.8).

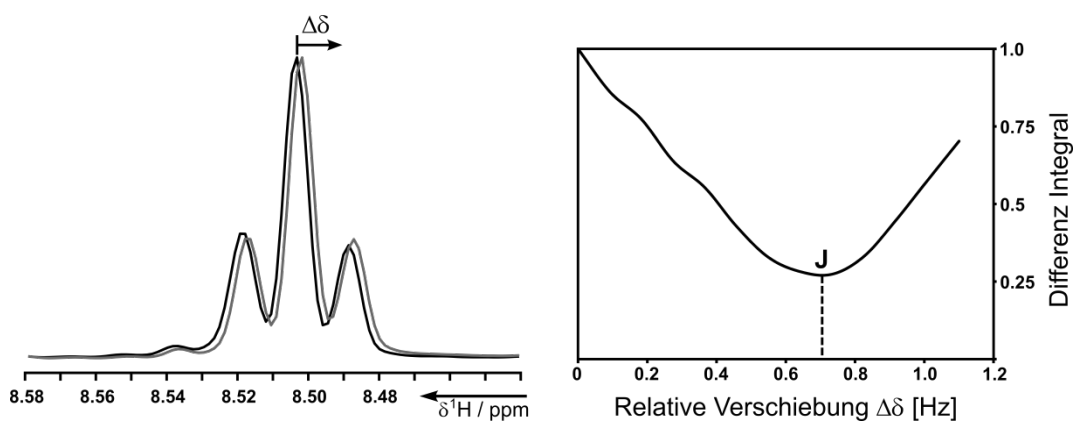


Abbildung 4.8 Auswertung des E.COSY Kopplungsmusters durch Verschieben der beiden Signalkomponenten zur Minimierung des Differenzintegrals. Links sind die Hoch- und Tieffeldkomponente in schwarz und grau überlagert, rechts das Differenzintegral als Funktion der relativen Verschiebung gezeigt.

Die  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{C}')$  Kopplung wurde in einem zweidimensionalen soft-H(N)CA-COSY bestimmt (WEISEMANN, RÜTERJANS *et al.* 1994). Hierbei handelt es sich um ein E.COSY Experiment wobei zur Auflösung der  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{C}')$  die  $^1J(\text{C}^{\alpha}\text{C}')$  Kopplung als passive Kopplung benutzt wird (siehe Abbildung 4.9).

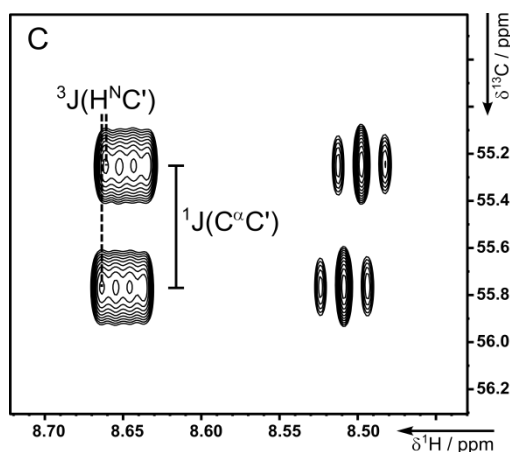


Abbildung 4.9 2D soft-H(N)CA-COSY gemessen an GCG. Die Signale sind in der direkten Dimension mit der zu messenden  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{C}')$  Kopplung verschoben und in der indirekten Dimension mit der passiven  $^1J(\text{C}^{\alpha}\text{C}')$  Kopplung aufgespalten.

Die  $^3J(\text{H}^{\alpha}\text{C}')$  Kopplung wurde mit einem 2D C'-gekoppeltem (H)N(Ca)Ha Experiment bestimmt (LÖHR und RÜTERJANS 1995). In diesem E.COSY-Experiment wird die  $^1J(\text{NC}')$  Kopplung als passive Kopplung genutzt (siehe Abbildung 4.10).

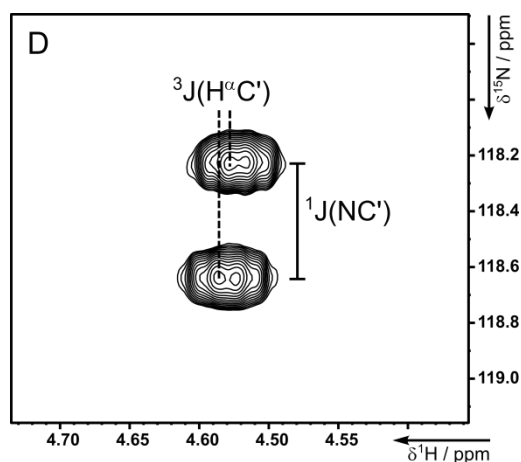


Abbildung 4.10  $\text{C}'$ -gekoppeltes 2D  $(\text{H})\text{N}(\text{Ca})\text{Ha}$  Experiment gemessen an GCG. Die passive  $^1\text{J}(\text{NC}')$  Kopplung in der indirekten Dimension ermöglicht das Auflösen der kleinen  $^3\text{J}(\text{H}^\alpha\text{C}')$  Kopplung in der direkten Dimension.

Zur Messung der  $^3\text{J}(\text{H}^\text{N}\text{C}^\beta)$  Kopplung wurde ein zweidimensionales  $\text{H}(\text{N})\text{Hb}[\text{Cb}]\text{-E.COSY}$  Experiment verwendet (LÖHR und RÜTERJANS 1999). Hier wird die  $^1\text{J}(\text{H}^\beta\text{C}^\beta)$  Kopplung als passive Kopplung genutzt, um die zu messende Kopplung auflösen zu können (siehe Abbildung 4.11).

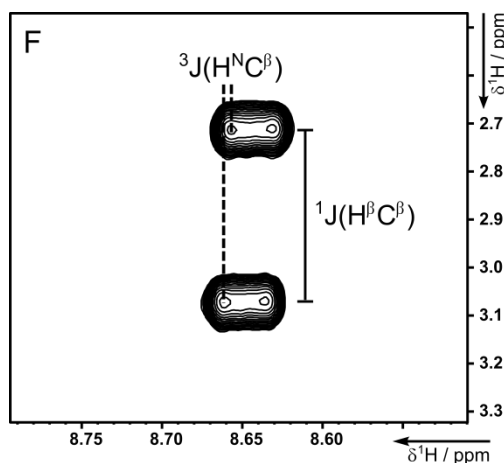


Abbildung 4.11 Ausschnitt aus dem 2D  $\text{H}(\text{N})\text{Hb}[\text{Cb}]\text{-E.COSY}$  Experiment gemessen an GCG. Gezeigt ist das  $\text{H}^\text{N}\text{H}^\beta$  Kreuzsignal zur Bestimmung der  $^3\text{J}(\text{H}^\text{N}\text{C}^\beta)$  Kopplung.

Mit den genannten Experimenten war es möglich für alle zehn untersuchten Peptide alle sechs Kopplungskonstanten mit hoher Präzision zu bestimmen. Die gemessenen Kopplungskonstanten sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Der in der Tabelle angegebene Fehler richtet sich dabei nach der jeweils verwendeten Methode. Für die  $^1J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$  Kopplung wurde der Fehler der Dekonvolution verwendet, für die  $^nJ(\text{NC}^\alpha)$  wurde der Fehler der Variablen aus der Ausgleichsrechnung angegeben. Sämtliche E.COSY Spektren wurden nach dem zuvor beschriebenen Prinzip ausgewertet (siehe Abbildung 4.8), als Fehler wurde der Wert für eine 5% Abweichung vom minimalen Differenzintegral verwendet.

|                                   | GAG             | GVG             | GFG             | GSG             | GEG             | GLG             | GTG             | GCG             | GDG             | GNG             |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $^3J(\text{H}^N\text{H}^\alpha)$  | 6.11<br>± 0.02  | 7.46<br>± 0.08  | 7.45<br>± 0.02  | 6.99<br>± 0.07  | 6.99<br>± 0.02  | 6.78<br>± 0.01  | 7.73<br>± 0.02  | 7.29<br>± 0.01  | 7.44<br>± 0.02  | 7.53<br>± 0.01  |
| $^3J(\text{H}^N\text{C}')^a$      | 1.18<br>± 0.07  | 0.91<br>± 0.12  | 0.88<br>± 0.15  | 0.87<br>± 0.18  | 0.94<br>± 0.11  | 0.84<br>± 0.09  | 0.84<br>± 0.08  | 0.87<br>± 0.08  | 1.19<br>± 0.09  | 0.99<br>± 0.09  |
| $^3J(\text{H}^\alpha\text{C}')^a$ | 2.02<br>± 0.1   | 2.33<br>± 0.15  | 2.20<br>± 0.27  | 2.77<br>± 0.32  | 2.07<br>± 0.16  | 2.45<br>± 0.03  | 2.74<br>± 0.05  | 2.79<br>± 0.03  | 3.24<br>± 0.24  | 2.88<br>± 0.10  |
| $^3J(\text{H}^N\text{C}^\beta)$   | 2.32<br>± 0.06  | 1.59<br>± 0.06  | 1.79<br>± 0.17  | 1.71<br>± 0.12  | 1.59<br>± 0.24  | 1.75<br>± 0.15  | 1.40<br>± 0.12  | 1.89<br>± 0.08  | 1.25<br>± 0.28  | 1.39<br>± 0.07  |
| $^1J(\text{NC}^\alpha)$           | 11.28<br>± 0.07 | 11.24<br>± 0.02 | 11.48<br>± 0.04 | 11.73<br>± 0.05 | 11.24<br>± 0.03 | 10.96<br>± 0.10 | 11.63<br>± 0.04 | 11.81<br>± 0.04 | 11.89<br>± 0.05 | 11.21<br>± 0.09 |
| $^2J(\text{NC}^\alpha)$           | 8.51<br>± 0.03  | 8.01<br>± 0.02  | 8.28<br>± 0.04  | 7.86<br>± 0.06  | 8.38<br>± 0.04  | 8.24<br>± 0.09  | 7.69<br>± 0.02  | 8.04<br>± 0.01  | 7.91<br>± 0.04  | 8.28<br>± 0.09  |

Tabelle 4.1      Gemessene Kopplungskonstanten für die untersuchte Serie von GXG-Peptiden.

### 4.1.3 Analyse der gemessenen Kopplungskonstanten für GXG-Peptide

Ziel der durchgeführten Analyse war es, die individuellen konformationellen Präferenzen einzelner Aminosäuren zu untersuchen.

Die gemessenen J-Kopplungen wurden hierzu in Verbindung mit Raman-, Infrarot- und Vibrations-Circulardichroismus-Spektren verwendet (SCHWEITZER-STENNER, HAGARMAN *et al.* 2010; SCHWEITZER-STENNER, HAGARMAN *et al.* 2011). Die Messungen hierzu wurden von der Gruppe von Prof. Schweitzer-Stenner durchgeführt.

Im Wesentlichen werden, bei der Diskussion der vorliegenden Konformationen, drei mögliche Konformationen berücksichtigt,  $\beta$ -Faltblatt, Polyprolin Typ II Helix (PPII) und rechtsgängige  $\alpha$ -Helix (siehe Abbildung 4.12).

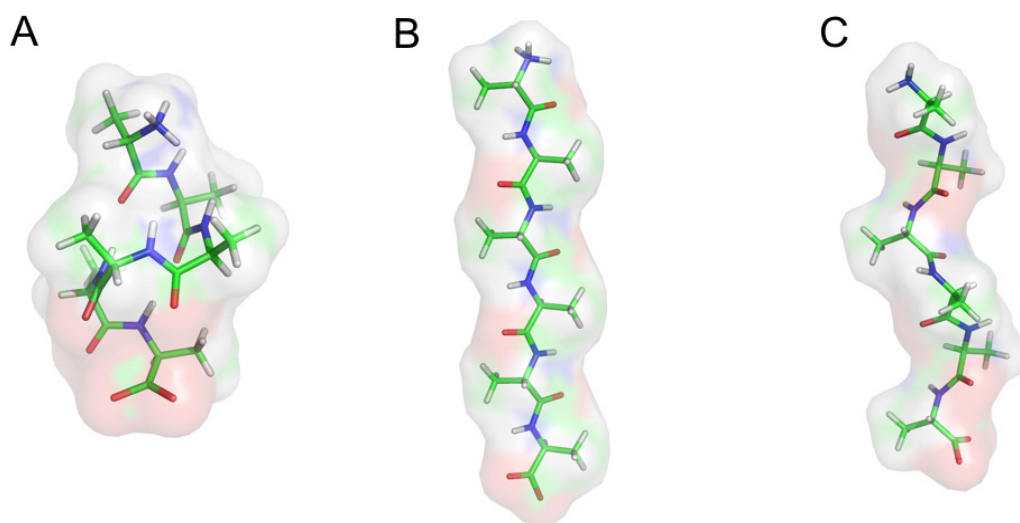


Abbildung 4.12 Sekundärstrukturelemente gezeigt für eine kurze Peptidkette. Dargestellt sind rechtsgängige  $\alpha$ -Helix (A),  $\beta$ -Faltblatt (B) und PPII Helix (C).

Bei der Untersuchung mittels Kopplungskonstanten ist zu beachten, dass sich verschiedene Kopplungskonstanten unterschiedlich gut eignen, um zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen zu unterscheiden, vor allem da die möglichen Winkel  $\phi$  und  $\psi$  zum Teil für zwei der Sekundärstrukturen überlappen. So ist die Unterscheidung zwischen  $\alpha$ -Helix und Polyprolin Typ II Helix anhand des  $\phi$ -Winkels kaum möglich (siehe Abbildung 4.13).

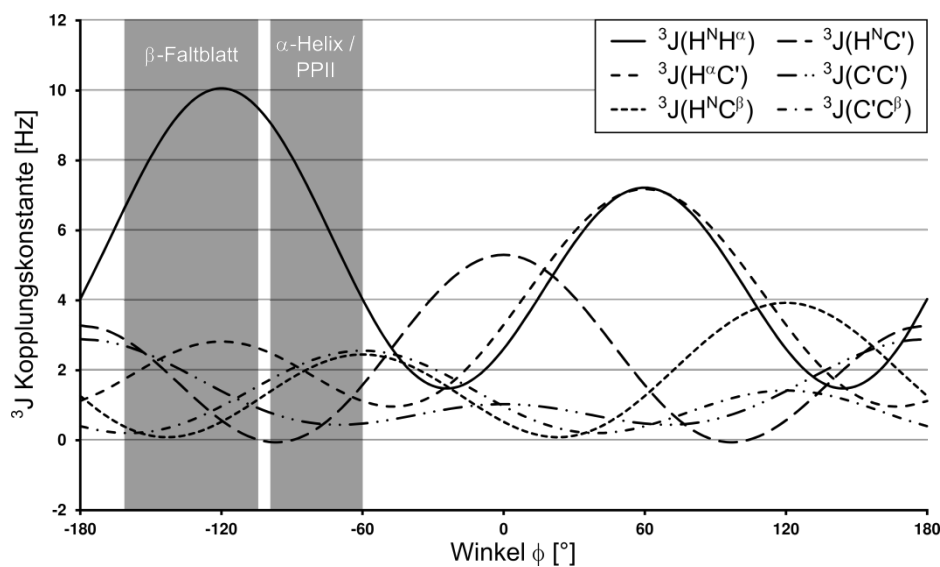


Abbildung 4.13 Karpluskurven für den Winkel  $\phi$  (HU und BAX 1997).

Im Gegensatz dazu ist die Unterscheidung von  $\beta$ -Faltblatt und PPII Helix anhand des Winkels  $\psi$  nicht möglich. Allerdings sind beispielsweise die  $\text{NC}^\alpha$  Kopplungen gut geeignet, um zwischen den gestreckten Konformationen und der kompakteren  $\alpha$ -Helix zu unterscheiden (siehe Abbildung 4.14).

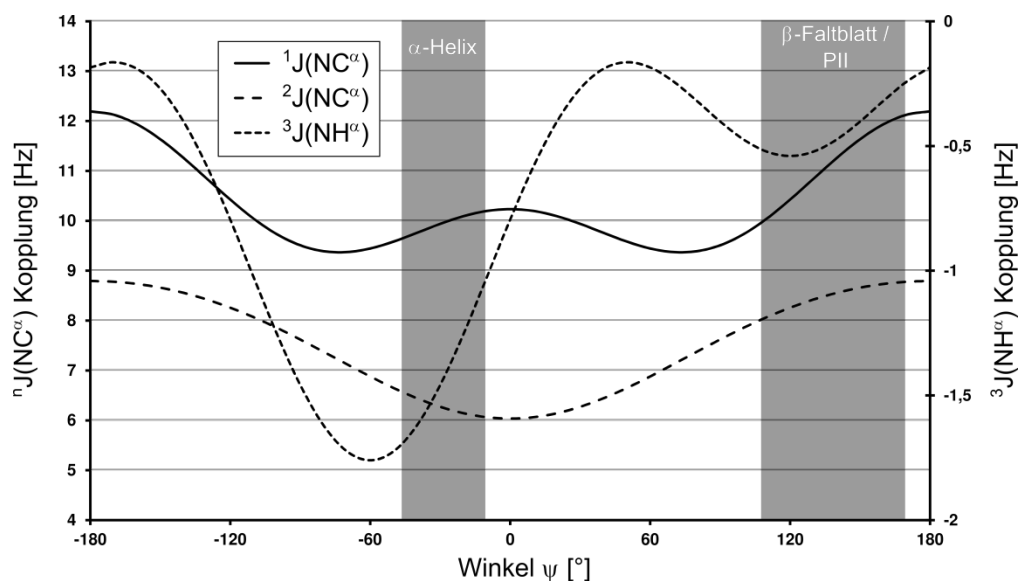


Abbildung 4.14 Karpluskurven für den Winkel  $\psi$  (WANG und BAX 1995; WIRMER und SCHWALBE 2002).

Aus den genannten Gründen ist in allen Fällen die Messung mehrerer, voneinander unabhängiger Kopplungskonstanten nötig, um eine Aussage über die Konformationsverteilung treffen zu können.

Trialanin wurde zuvor mit einer Kombination von NMR-Spektroskopie und MD-Simulationen in einer Serie von homologen Polyalaninpeptiden untersucht (SHI, OLSON *et al.* 2002; CHEN, LIU *et al.* 2004; GRAF, NGUYEN *et al.* 2007). Die Untersuchungen ergaben einen hohen Anteil an Polyprolin Typ II helikaler Konformation. Neben PPII wurde beinahe ausschließlich eine zweite gestreckte Konformation,  $\beta$ -Faltblatt populierte.  $\alpha$ -helikale Konformationen wurden nur zu einem geringen Prozentsatz populierte.

Die Untersuchungen von GAG ergaben ebenfalls einen hohen Anteil an PPII. Zunächst fällt auf, dass Alanin von allen untersuchten Aminosäuren die niedrigste  $H^N H^\alpha$  Kopplung aufweist. Für ein  $\beta$ -Faltblatt ist die erwartete Kopplung  $> 8$  Hz, der  $\phi$  Winkel beträgt etwa  $-120^\circ$ . Eine deutlich kleinere Kopplung kann entweder bedeuten, dass der PPII Bereich populierte ist, denn dieser weist mit einem  $\phi$  Winkel von etwa  $-80^\circ$  eine  $H^N H^\alpha$  Kopplung von 6 Hz auf. Eine zweite Erklärung für die 6,11 Hz Kopplung ist eine gleichzeitige Population von  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -helikalem Bereich. Betrachtet man zusätzlich noch die

große  $^1J(\text{NC}^\alpha)$  Kopplung von 11,28 Hz, so schließt dies die Möglichkeit der signifikanten Population des  $\alpha$ -helikalen Bereiches aus. Die Größe der  $\text{H}^\alpha\text{C}'$  Kopplung spricht ebenfalls für die Population von PPII und gegen eine Kombination von  $\alpha$ -Helix und  $\beta$ -Faltblatt, da die  $\text{H}^\alpha\text{C}'$  Kopplung in diesem Fall größer wäre. Ebenfalls gegen das Vorhandensein von  $\alpha$ -helikalen Strukturen spricht die große  $^2J(\text{NC}^\alpha)$  Kopplung. Die Daten stehen ebenfalls im Einklang mit den gemessenen Raman-, Infrarot- und Vibrations-Circulardichroismus-Daten. Die quantitative Analyse ergab eine Population von 79% PPII.

Betrachtet man Valin, so ist die  $\text{H}^{\text{N}}\text{H}^\alpha$  Kopplung deutlich größer (7,46 Hz), was auf einen erhöhten  $\beta$ -Faltblatt Anteil deutet. Auch hier spricht die große  $^1J(\text{NC}^\alpha)$  Kopplung von 11,24 Hz gegen das Auftreten von  $\alpha$ -helikalen Strukturen. Gleichzeitig beobachtet man beim Vergleich mit Alanin eine Abnahme der  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{C}^\beta)$  Kopplung, was auf eine Verschiebung der Population von PPII zu  $\beta$ -Faltblatt hindeutet und gegen die Population des  $\alpha$ -helikalen Bereiches spricht. Die quantitative Analyse in Verbindung mit den komplementären spektroskopischen Daten liefert hier eine Population der PPII Bereiches von 40%, wobei der  $\beta$ -Faltblatt Bereich mit 38% ähnlich stark populiert ist.

Die Kopplungskonstanten für die dritte aliphatische Aminosäure Leucin liegen etwa in der Mitte zwischen den Werten für Alanin und Valin, was eine Population von hauptsächlich PPII- und  $\beta$ -Faltblatt Struktur nahe legt. Lediglich die kleinere  $^1J(\text{NC}^\alpha)$  Kopplung von 10,96 Hz deutet darauf hin, dass auch  $\alpha$ -helikale Strukturen populiert werden. Die Analyse, in Kombination mit den photometrischen Daten, liefert hier neben 56% PPII und 24%  $\beta$ -Faltblatt auch 10% linksgängige  $\alpha$ -Helix. Dieses Verhalten ist vor allem damit zu erklären, dass die Leucin-Seitenkette zwar länger ist als die von Alanin, der sterische Anspruch jedoch, vor allem in der Nähe der Rückgrates, kleiner ist als der von Valin.

Deutlich wird dieser Effekt auch bei der Betrachtung von Phenylalanin. Hier sind sehr ähnliche Werte wie für Valin zu beobachten, was die Vermutung nahe legt, dass auch hier der sterische Anspruch dazu führt, dass hauptsächlich die gestreckten Konformationen PPII und  $\beta$ -Faltblatt mit 42 und 40% populiert sind.

Die Seitenkette von Serin ist ähnlich der von Alanin jedoch polarer, was in der Regel die  $\beta$ -Faltblatt Konformation begünstigt (TRAN, WANG *et al.* 2005). Tatsächlich spricht die



geringfügig größere  $H^N H^\alpha$  Kopplung, verglichen mit Alanin, für eine Zunahme des  $\beta$ -Faltblatt Anteils. Die größere  $^3J(H^\alpha C')$  Kopplung deutet jedoch auch darauf hin, dass die  $\alpha$ -helikalen Konformationen vorliegen. Die quantitative Analyse ergab, dass neben 45% PPII und 30%  $\beta$ -Faltblatt auch links- und rechtsgängige  $\alpha$ -Helices mit 10 und 15% auftreten.

Für die ebenfalls polare Aminosäure Threonin werden recht ähnliche Werte für die Kopplungskonstanten beobachtet wie für Serin (die durchschnittliche Abweichung ist kleiner als 0,4 Hz), jedoch mit einer deutlich größeren  $^3J(H^N H^\alpha)$  Kopplung, was durch eine weitere Abnahme der PPII Population zugunsten der  $\beta$ -Faltblatt Population zu erklären ist. Auch hier werden wieder bis zu 30% der  $\alpha$ -helikalen Konformationen beobachtet.

Cystein scheint sich in erster Näherung wie Serin zu Verhalten. Die etwas größere  $^3J(H^N H^\alpha)$  Kopplung deutet auf eine etwas höhere Population der PPII Region hin. Die verringerte Polarität verglichen mit Serin führt im Fall von Cystein höchst wahrscheinlich dazu, dass die  $\beta$ -Faltblatt Konformation weniger stark populiert wird, wohingegen die PPII Konformation dominanter ist.

Die geladene Aminosäure Glutaminsäure verhält sich ähnlich wie die aliphatischen Aminosäuren: Die kleine  $^3J(H^N H^\alpha)$  Kopplung sowie die große  $^1J(NC^\alpha)$  Kopplung deuten auch hier auf eine hohe Population von PPII sowie  $\beta$ -Faltblatt hin, wobei kaum  $\alpha$ -Helices vorliegen. Die Ähnlichkeit ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die Untersuchungen bei pH = 2 durchgeführt wurden, und die Seitenkette mit einem  $pK_a$  Wert von 2.1 zu einem erheblichen Anteil protoniert vorliegt, d.h. ungeladen.

Asparaginsäure, welche lediglich eine um eine  $CH_2$ -Gruppe kürzere Seitenkette besitzt verglichen mit Glutaminsäure, verhält sich völlig unterschiedlich zu dieser: Zunächst deutet die größere  $H^N H^\alpha$  Kopplung darauf hin, dass der Anteil an PPII deutlich geringer ist. Gleichzeitig deutet eine größere  $^3J(H^\alpha C')$  Kopplung darauf hin, dass auch die  $\alpha$ -helikalen Bereiche deutlich populiert werden. Widersprüchlich ist lediglich die viel kleinere  $^3J(H^N C^\beta)$ , die allerdings im Falle von GDG mit einem größeren Fehler behaftet ist. Dies kann auch darauf zurückgeführt werden, dass neben den favorisierten Bereichen des Ramachandran Plots in diesem Fall auch andere Konformationen vorliegen: Beispielsweise

lässt sich das Auftreten einer sehr kleinen  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{C}^{\beta})$  Kopplung, in Verbindung mit einer großen  $^3J(\text{H}^{\alpha}\text{C}')$  Kopplung, auch mit  $\phi$ -Winkeln zwischen 0 und 60 ° erklären.

Asparagin hingegen zeigt eine ähnlich große  $^3J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$  Kopplung, jedoch eine kleinere  $^3J(\text{H}^{\alpha}\text{C}')$  Kopplung was durch eine Kombination von hauptsächlich PPII, sowie einem Anteil an  $\beta$ -Faltblatt und  $\alpha$ -Helix erklärt werden kann.

## 4.2 Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten an isotoopenmarkierter RNA

### 4.2.1 Das constant-time $^{13}\text{C}$ IPAP-HSQC Experiment

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 1.3.1), ist eine der Möglichkeiten, Kopplungskonstanten zu messen, ohne dabei zusätzliche Überlagerungen zu erhalten, das IPAP-Experiment (OTTIGER, DELAGLIO *et al.* 1998).

Betrachtet man beispielsweise die Zuckerregion in  $^{13}\text{C}$  markierter RNA, so besteht zusätzlich das Problem der CC-Kopplung. Während sich die C1'-Region in ihrer chemischen Verschiebung unterscheidet, z.B. von der C2'-Region, sodass eine selektive Entkopplung möglich ist, so ist eine unabhängige Anregung bzw. Inversion von C2' und C3' bereits nicht mehr möglich.

Eine weitere Methode, um die homonukleare Kopplung zu refokussieren, ist die Entwicklung der chemischen Verschiebung in einer konstanten Zeit, die so gewählt wird, dass sie  $n/J_{\text{CC}}$  entspricht, wodurch die homonukleare Kohlenstoffkopplung refokussiert wird. Diese Methode wurde kombiniert mit der IPAP-Technik, um  $^1\text{J}(\text{CH})$  Kopplungskonstanten in der Zuckerregion von RNA messen zu können (siehe Abbildung 4.15).

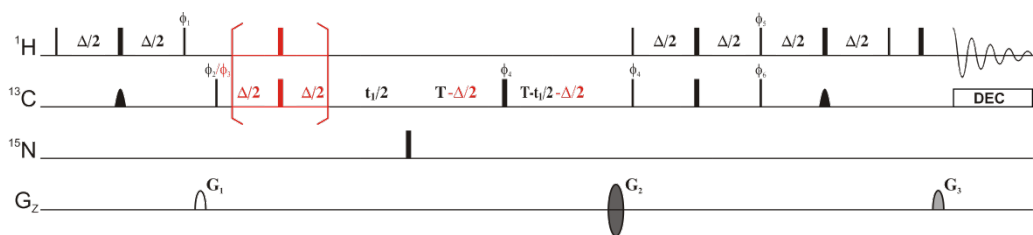


Abbildung 4.15 Pulssequenz des sensitivitätsgesteigerten constant-time IPAP HSQCs. Die in rot gekennzeichneten Elemente führen zum Anti-phase Spektrum. Schmale und breite Linien repräsentieren  $90^\circ$  und  $180^\circ$  Pulse mit der Phase  $x$ , sofern nicht anders angegeben. Geschapte Pulse auf dem  $^{13}\text{C}$  Kanal repräsentieren adiabatische  $180^\circ$  Pulse. Die Zeit  $\Delta$  wurde auf  $1/2J_{\text{CH}} = 1.75$  ms gesetzt. Die constant-time  $T$  wurde auf  $1/J_{\text{CC}} = 12.5$  ms gesetzt.  $^{13}\text{C}$  Entkopplung wurde mit  $B_1 = 4.5$  kHz angewendet. Die Phasen sind:  $\phi_1 = y, -y$ ;  $\phi_2 = x, -x$ ;  $\phi_3 = y, -y$ ;  $\phi_4 = x, x, -x, -x$ ;  $\phi_5 = y$ ;  $\phi_6 = y, y, -y, -y$ ;

$\phi_{\text{rec}} = x, x, x, x$ . Die Gradientenstärken sind  $G_1 = 6 \text{ G cm}^{-1}$ ;  $G_2 = 44 \text{ G cm}^{-1}$ ;  $G_3 = 11.06 \text{ G cm}^{-1}$ .  
 Quadratur Detektion in  $\omega_1$  wurde durch Inversion von  $G_2$  und Inkrementierung von  $\phi_4$  und  $\phi_6$  gemäß der Echo/Antiecho und TPPI Methode erreicht.

Die oben gezeigte Sequenz ist nicht länger als ein reguläres *constant-time* HSQC Experiment. Die Empfindlichkeit verringert sich daher nicht, abgesehen vom Verlust durch die Aufspaltung in zwei Signale in der indirekten Dimension. Das Element zum Entwickeln der Kopplung, um das Inphase- und Antiphase-Spektrum zu erzeugen, wurde in die *constant-time* inkorporiert, was lediglich zu einer Reduktion der maximal möglichen Punkte führt. Die beiden Spektren werden zeilenweise abwechselnd aufgenommen, um einen systematischen Fehler durch das Aufnehmen nacheinander auszuschließen. Anschließend können die beiden Spektren addiert bzw. subtrahiert werden, um die Hoch- und Tieffeldkomponente jedes Dubletts in zwei verschiedene Spektren zu separieren (siehe Abbildung 4.16).

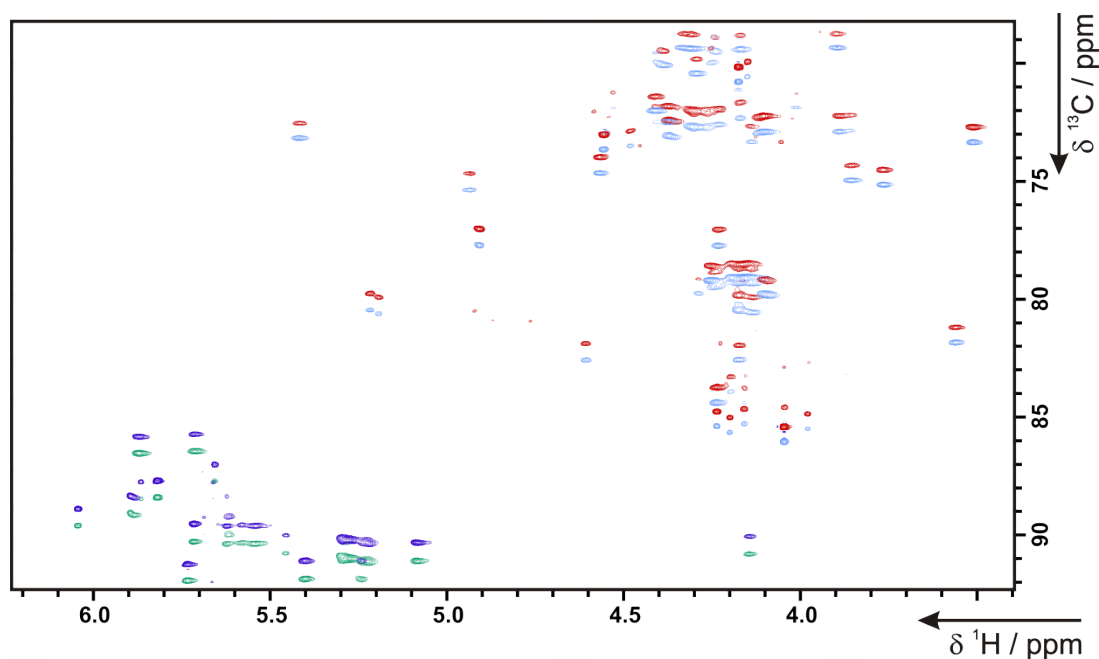


Abbildung 4.16  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  sensitivitätsgesteigertes *constant-time* IPAP HSQC gezeigt für die Zuckerregion (C1'-C4') einer 24mer RNA. Das Spektrum wurde an einem Bruker Avance III 950 MHz Spektrometer mit cryogenem HCN Trippelresonanz Probenkopf mit  $z$ -Gradienten aufgenommen. Gezeigt ist die Überlagerung der beiden Subspektren nach Addition bzw. Subtraktion. Das Vorzeichen richtet sich nach der Anzahl der koppelnden Kohlenstoff-Kerne.

Selbst für dieses kleine RNA-Molekül ist der Vorteil der IPAP-Separation direkt zu sehen. Selbst in der C1'H1' Region zwischen 5 und 6 ppm in der Protonendimension, die normalerweise selbst für größere RNA-Moleküle recht gut aufgelöst ist, kann man erkennen, dass die Aufspaltung in der indirekten Dimension zu überlagerten Signalen führt, was durch die Separation in zwei Subspektren aufgehoben wird.

#### 4.2.2 Das J-modulierte HCCH-COSY Experiment

Das bereits beschriebene IPAP-Experiment zur Bestimmung von Kopplungskonstanten ist in der Lage, Kopplungen zuverlässig bis zu einer bestimmten RNA-Größe zu bestimmen. Die Präzision ist im Wesentlichen durch die spektrale Auflösung und somit durch die Wahl der *constant-time* begrenzt. Prinzipiell ist jede Zeit, die  $n/J_{CC}$  folgt, möglich, allerdings führt dies im Fall von RNA-Molekülen mit mehr als etwa 30 Nukleotiden schnell zu einem Abfall der Empfindlichkeit aufgrund der  $T_2$  Relaxation.

Ein weiteres Experiment, dass im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, ist das J-modulierte HCCH-COSY Experiment. Es dient dazu die  $^1J(C2'H2')$  Kopplung zu messen. Die Messung dieser Kopplung ist normalerweise durch den Überlapp in der C2'H2' Region des Spektrums erschwert. Das J-modulierte HCCH-COSY Experiment entwickelt, startend von H2', diese Kopplung und transferiert die Information anschließend auf die C1'H1' Resonanzen. Auf diese Weise ist es möglich, die Kopplung auf den besser aufgelösten C1'H1' Resonanzen zu messen, ohne die C2'H2' Signale zuordnen zu müssen. Dies ist vor allem bei größeren RNA-Molekülen nützlich, da hier eine Zuordnung der kompletten Zuckerregion oft nicht möglich ist. Die C1'H1' Resonanzen lassen sich mittels des HCN Experiments (SKLENAR, PETERSON *et al.* 1993) in der Regel durch Korrelation mit der zugehörigen Base zuordnen.

Das hier gezeigte Experiment (siehe Abbildung 4.17) ist dem HCCH-COSY Experiment, wie es für Proteine angewendet wird (KAY, XU *et al.* 1993) ähnlich.

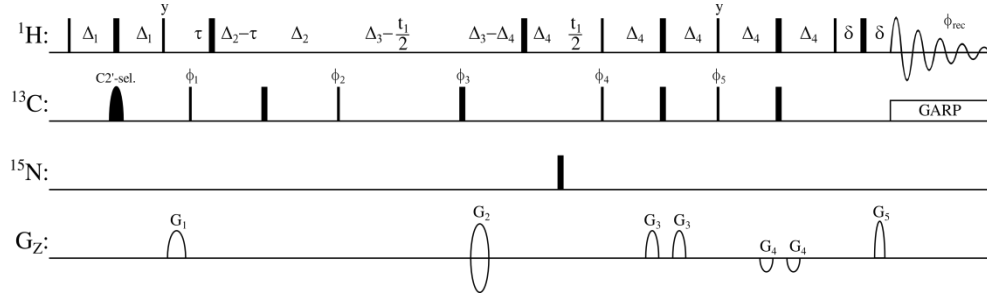


Abbildung 4.17 Constant-time HCCH-COSY Experiment zur  $J$ -modulierten Messung von  $^1J(C2'H2')$ . Schmale und breite Linien repräsentieren  $90^\circ$  und  $180^\circ$  Pulse mit der Phase  $x$  sofern nicht anders angegeben. Alle unselektiven Pulse wurden bei 4.7 ppm für Protonen, 88 ppm für Kohlenstoff und 154 ppm für Stickstoff eingestrahlt. Als C2'-selektiver  $180^\circ$  Puls wurde eine 2 ms Gauss-Kaskade bei 55 ppm angewendet. Die Zeiten  $\Delta_1 = 1/4J(C2'H2')$ ,  $\Delta_2 = 1/8J(C1'C2')$ ,  $\Delta_3 = 1/4J(C1'C2')$ ,  $\Delta_4 = 1/4J(C1'H1')$ . Die Phasen sind  $\phi_1 = x, x$ ,  $\phi_2 = 4x, 4x$ ,  $\phi_3 = x$ ,  $\phi_4 = x, x, x, x$ ,  $\phi_5 = y, y, y, y$ ,  $\phi_{rec} = x, x, x, x$ . Gradientenlängen sind  $G_1, G_2 = 1$  ms,  $G_3, G_4 = 0,5$  ms,  $G_5 = 0,25$  ms. Gradientstärken sind  $G_1 = 22,5$  G/cm,  $G_2 = 44$  G/cm,  $G_3 = 6,05$  G/cm,  $G_4 = -2,75$  G/cm,  $G_5 = 44,22$  G/cm. Kohlenstoff GARP Entkopplung wurde mit einer Feldstärke von 3,5 kHz angewendet. Phasensensitive Spektren wurden durch Inversion von  $G_2$  und Inkrementierung von  $\phi_3$ ,  $\phi_4$  und  $\phi_5$  nach der Echo/Anti-Echo und TPPI Methode erhalten.

Während des ersten INEPT-Transfers wird Antiphase Magnetisierung  $2H2'_x C2'_z$  erzeugt. Diese wird durch zwei  $90^\circ$  Pulse in  $2H2'_z C2'_y$  Magnetisierung überführt.

Während des ersten CC-COSY Transferschrittes wird die  $C1'C2'$  Kopplung evolviert. Für  $\Delta_2 = 1/2J(C1'C2')$  erhält man Magnetisierung der Form  $4H2'_z C2'_x C1'_z$ . Da sich allerdings gleichzeitig  $C2'C3'$  Kopplung entwickelt, erhält man durch die zweifache Modulation für den Fall  $\Delta = 1/2J$  einen Nulldurchgang der Transferamplitude, weshalb  $1/4J$  verwendet wurde. Gleichzeitig wird durch den  $180^\circ$  Protonenpuls, dessen Position durch die Zeit  $\tau$  bestimmt wird, die  $C2'H2'$  Kopplung teilweise refokussiert.

Am Ende des ersten CC-COSY Transferschrittes liegen somit die Operatoren  $4H2'_z C2'_x C1'_z \cos(2\pi J_{C2'H2'} \tau)$  und  $2C2'_y C1'_z \sin(2\pi J_{C2'H2'} \tau)$  vor.

Durch den folgenden  $90^\circ_y$  Kohlenstoff Puls wird der erste Term in Multiquanten-Magnetisierung der Form  $H2'_z C2'_x C1'_x$  überführt. Für diesen Term findet keine

Entwicklung der CC-Kopplung statt. Er wird daher nicht in detektierbare Magnetisierung überführt. Der zweite Term wird in C1'C2' Antiphase Magnetisierung der Form  $2C2'_zC1'_x\sin(2\pi J_{C2'H2'}\tau)$  überführt.

Während des folgenden zweiten CC-COSY Transferschrittes wird die C1'C2' Kopplung refokussiert und gleichzeitig C1'H1' Kopplung entwickelt. Man erhält  $2C1'_xH1'_z\sin(2\pi J_{C2'H2'}\tau)$  Magnetisierung. Während des CC-Transfers wird in einer *constant-time* Art und Weise die C1' chemische Verschiebung evolviert.

Die danach vorliegenden Terme  $2C1'_xH1'_z\sin(2\pi J_{C2'H2'}\tau)\cos(\omega_{C1'}t_2)$  und  $2C1'_yH1'_z\sin(2\pi J_{C2'H2'}\tau)\sin(\omega_{C1'}t_2)$  werden durch einen sensitivitätssteigerten Rücktransfer in detektierbare Inphase H1' Magnetisierung überführt.

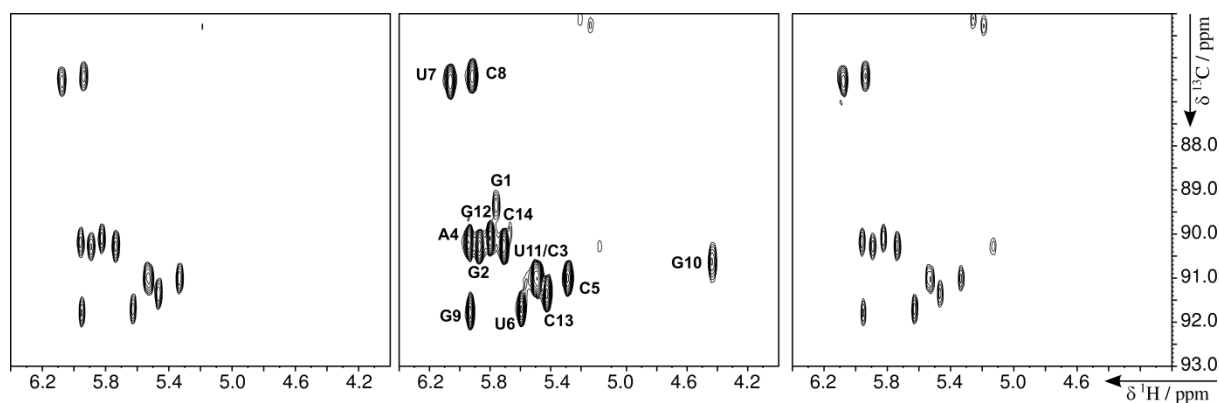


Abbildung 4.18 Constant-time HCCH-COSY Spektrum gemessen an einem RNA 14mer. Gezeigt sind die Ebenen für die Werte  $\tau = 0,5$  ms, 3 ms und 6 ms.

Für ein RNA 14mer (siehe Abbildung 4.19) konnten so 12 der 14 C2'H2' Kopplungen bestimmt werden. Die beiden fehlenden Kopplungskonstanten konnten nicht bestimmt werden, da die Signale U11 und C3 aufgrund der Überlappung nicht ausgewertet werden konnten (siehe Abbildung 4.18).

Die Auswertung erfolgte durch Fitten der Funktion  $I(\tau) = I_0 \sin(\pi J_{C2'H2'}\tau)$ , um die experimentellen Datenpunkte zu beschreiben, wobei als Variablen  $I_0$  und  $J_{C2'H2'}$  bestimmt wurden. Diese Analyse wurde mit dem Programm SigmaPlot durchgeführt.





Spektren wurden durch Inversion von  $G_2$  und Inkrementierung von  $\phi_3$ ,  $\phi_4$  und  $\phi_5$  nach der Echo-/Anti-Echo und TPPI Methode erhalten.

Durch die Entwicklung der C1' chemischen Verschiebung in einer *semi constant-time* Art wird die Anzahl der Punkte, die in der indirekten Dimension aufgenommen werden können, nicht länger begrenzt. Allerdings wird die Sequenz durch die längere Dauer des einzelnen Experiments geringfügig unempfindlicher. Die mögliche Steigerung der Auflösung ist in Abbildung 4.21 gezeigt.

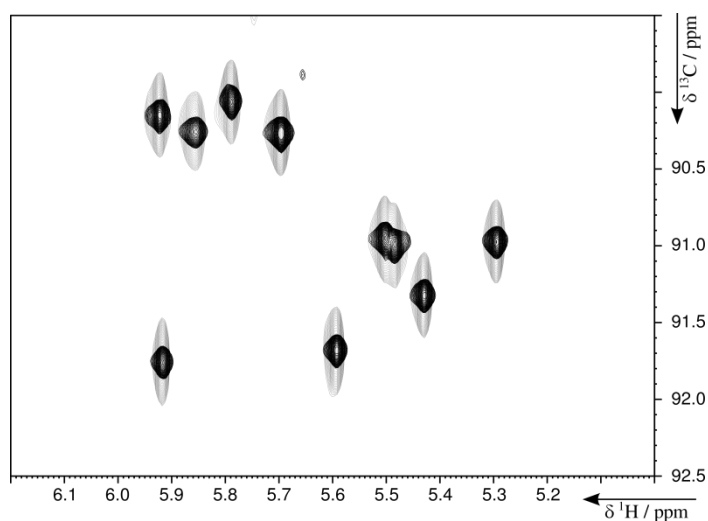


Abbildung 4.21 *Semi constant-time* HCCH-COSY (schwarz) und *constant-time* HCCH-COSY Experiment (grau) im Vergleich. Gezeigt ist die Ebene für  $\tau = 3$  ms. Das *semi constant-time* Experiment wurde mit der dreifachen Anzahl an Inkrementen aufgenommen in der doppelten experimentellen Zeit.

Um die generelle Empfindlichkeit und Präzision der Methode zu demonstrieren, wurden die zuvor an einem Modellsystem durchgeführten Messungen an einem selektiv G/C  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  markierten RNA 37mer bei zwei verschiedenen Feldstärken durchgeführt (siehe Abbildung 4.22).

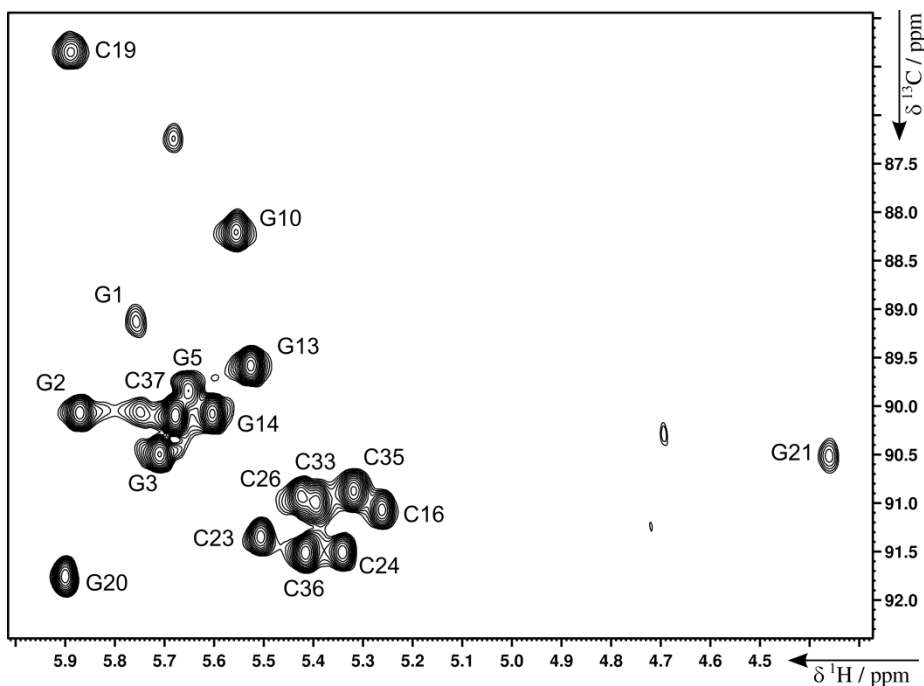


Abbildung 4.22 Constant-time HCCH-COSY Spektrum, gemessen an einem selektiv G/C  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  markierten RNA 37mer. Gezeigt ist die Ebene für  $\tau = 3$  ms.

Die beschriebene Pulssequenz erlaubt es in diesem Fall, für alle zuvor zugeordneten Signale die C2'H2' Kopplung mit einer Präzision kleiner als 1 Hertz zu bestimmen. Der Vergleich der beiden Feldstärken 600 und 900 MHz zeigt außerdem, dass diese Präzision notwendig ist, um für ein Molekül dieser Größe die dipolaren Restkopplungen messen zu können, die aus der Ausrichtung des Moleküls selbst im Magnetfeld resultieren. Die bestimmten Restkopplungen bei 900 MHz sind in Abbildung 4.23 gezeigt.

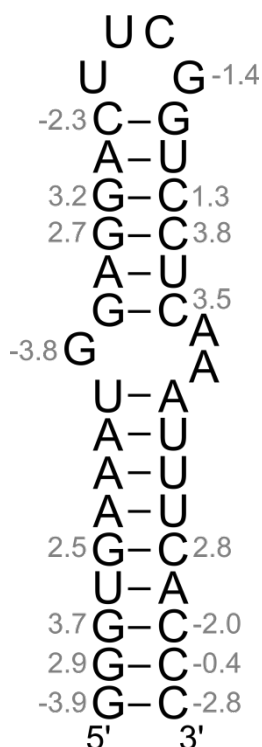


Abbildung 4.23 Dipolare Restkopplungen gemessen für die Selbstausrichtung im Magnetfeld an einem RNA 37mer. Angegeben sind die Kopplungen bei 900 MHz.

Um die Anwendbarkeit auch für größere Systeme zu demonstrieren, wurde die entwickelte Sequenz an einem selektiv markierten RNA 70mer getestet.

Bei dem verwendeten RNA-Molekül handelt es sich um die Aptamerdomäne des 2-Deoxyguanosin bindenden Riboswitches aus *mesoplasma florum* (KIM, ROTH *et al.* 2007), die zuvor bereits NMR-spektroskopisch untersucht wurde (WACKER, BUCK *et al.* 2011). Die Messung wurde an einer selektiv Adenosin-markierten Probe durchgeführt. Sechs zweidimensionale Ebenen konnten, mit ausreichendem Signal-zu-Rausch-Verhältnis, innerhalb von 40 Stunden, an einem Bruker 800 MHz Avance Spektrometer, ausgerüstet mit cryogenem Probenkopf, aufgenommen werden. Die Ebene für eine Mischzeit von 3 ms ist gezeigt in Abbildung 4.24.

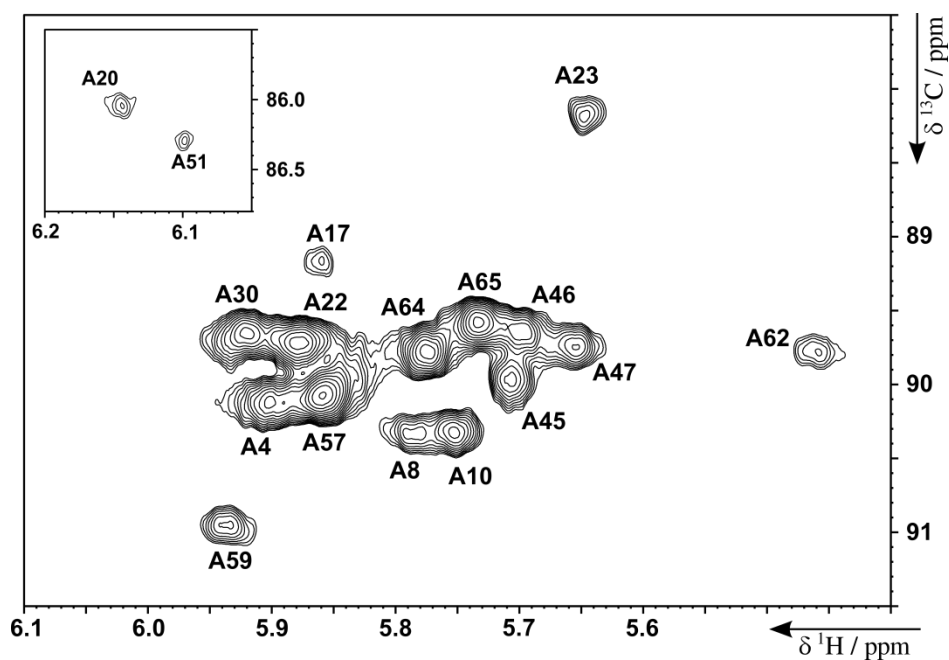


Abbildung 4.24 Constant-time HCCH-COSY gemessen an einem selektiv Adenosin  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$  markierten RNA 70mer. Gezeigt ist die Ebene für  $\tau = 3$  ms.

Für die Auswertung wurden die Signalpositionen in der Ebene maximaler Intensität bestimmt und anschließend die Intensitäten aller Ebenen an der jeweiligen Position gemessen. Die Kopplungskonstanten wurden durch Angleichen der Funktion  $I(\tau) = I_0 \sin(\pi J_{\text{C}2'\text{H}2'} \tau)$  an die experimentellen Daten extrahiert (siehe Abbildung 4.25).

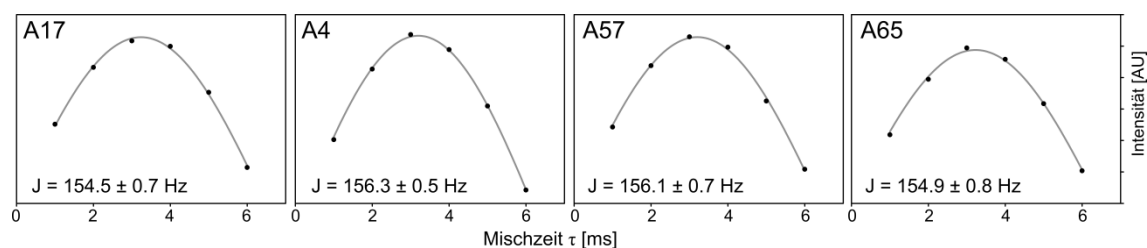


Abbildung 4.25 Fit von experimentellen Daten (schwarze Punkte) und der theoretischen Funktion  $I(\tau) = I_0 \sin(\pi J_{\text{C}2'\text{H}2'} \tau)$  (graue Linie). Bei den angegebenen Fehlern handelt es sich um den Fehler der Regression.

Mit dem beschriebenen Experiment konnten für alle der bereits zugeordneten Signale Kopplungskonstanten bestimmt werden, wobei nur zwei der Kopplungskonstanten einen Fehler von mehr als 2 Hertz aufwiesen. Sieben von fünfzehn der zugeordneten Signale hingegen zeigten einen Fehler von 1 Hz oder weniger (siehe Abbildung 4.26).

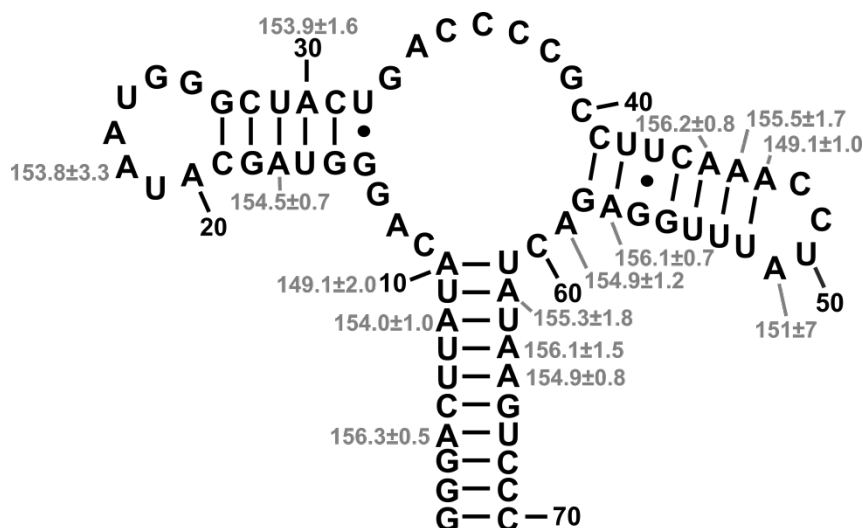


Abbildung 4.26 Sekundärstruktur der Aptamerdomäne des 2-Deoxyguanosin bindenden Riboswitches aus *Mesoplasma florum* und die gemessenen  $^1J(\text{C2}'\text{H2}')$  Kopplungskonstanten.

### 4.2.3 Das J-modulierte HCC-COSY Experiment

Die bisher gezeigten Experimente waren in der Lage,  $^1J(\text{CH})$  Kopplungen zu bestimmen.

Die Messung von  $^1J(\text{CC})$  Kopplungen ist grundsätzlich nicht weniger von Interesse. Zum Einen ist es möglich, neben  $^1D(\text{CH})$  dipolaren Restkopplungen auch  $^1D(\text{CC})$  dipolare Restkopplungen zu bestimmen. Diese betragen zwar aufgrund des niedrigeren gyromagnetischen Verhältnisses und der höheren Bindungslänge in der Regel nur etwa 1/8 bis 1/10 der  $^1D(\text{CH})$  Kopplungen, liefern aber dennoch Strukturinformationen. Zum Anderen beinhalten auch die  $^1J(\text{CC})$  Kopplungen strukturelle Informationen, z.B. über die Zuckerkonformation (NOZINOVIC, GUPTA *et al.* 2011).

Wie bereits unter 4.2.2 diskutiert, ist es schwierig, C2' und C3' Resonanzen für größere RNA-Moleküle zuzuordnen. Das entwickelte J-modulierte HCC-COSY Experiment (siehe

Abbildung 4.27) detektiert die  $C1'C2'$  sowie die  $C2'C3'$  Kopplung auf den  $H1'C1'$  Resonanzen.

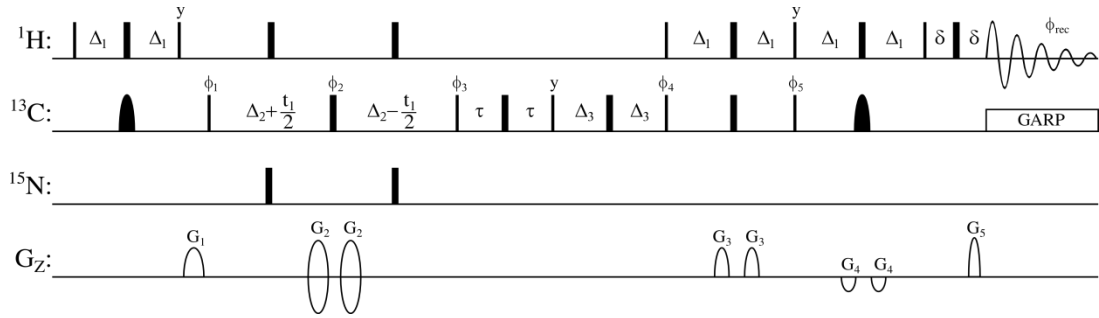


Abbildung 4.27 HCC-COSY Experiment zur simultanen,  $J$ -modulierten Messung von  $^1J(C1'C2')$  und  $^1J(C2'C3')$ . Schmale und breite Linien repräsentieren  $90^\circ$  und  $180^\circ$  Pulse mit der Phase  $x$  sofern nicht anders angegeben. Alle unselektiven Pulse wurden bei 4.7 ppm für Protonen, 88 ppm für Kohlenstoff und 154 ppm für Stickstoff eingestrahlt. Als  $C1'$ -selektiver  $180^\circ$  Puls wurde eine 1 ms Gauss-Kaskade bei 88 ppm angewendet. Die Zeiten  $\Delta_1 = 1/4J(C1'H1')$ ,  $\Delta_2 = 1/4J(C1'C2')$ ,  $\Delta_3 = 1/8J(C1'C2')$ . Die Phasen sind  $\phi_1 = x, x$ ,  $\phi_2 = 4x, 4x$ ,  $\phi_3 = 4y, 4y$ ,  $\phi_4 = x, x, x, x$ ,  $\phi_5 = y, y, y, y$ ,  $\phi_{rec} = -x, x, x, x$ . Gradientenlängen sind  $G_1, G_2 = 1$  ms,  $G_3, G_4 = 0,5$  ms,  $G_5 = 0,25$  ms. Gradientstärken sind  $G_1 = 22,5$  G/cm,  $G_2 = 22$  G/cm,  $G_3 = 6,05$  G/cm,  $G_4 = -2,75$  G/cm,  $G_5 = 44,22$  G/cm. Kohlenstoff GARP Entkopplung wurde mit einer Feldstärke von 3,5 kHz angewendet. Phasensensitive Spektren wurden durch Inversion von  $G_2$  und Inkrementierung von  $\phi_3$ ,  $\phi_3$ ,  $\phi_4$  und  $\phi_5$  nach der Echo/Anti-Echo und TPPI Methode erhalten.

Bei dem Experiment handelt es sich um ein „out and back“ Experiment. Die Magnetisierung wird, ausgehend von  $H1'$ , mittels eines INEPT Transfers in  $2H1'_zC1'_y$  Magnetisierung überführt.

Durch einen anschließenden CC-COSY Transferschritt wird die Magnetisierung in  $4H1'_zC1'_zC2_x$  überführt, zusätzlich wird in der konstanten CC-COSY Transferzeit die  $C1'$  chemische Verschiebung entwickelt.

Während der variablen Zeit  $\tau$  entwickelt sich  $C2'C1'$  sowie  $C2'C3'$  Kopplung. Der Operator der Magnetisierung wird demnach durch diese beiden Kopplungen moduliert und kann ausgedrückt werden durch  $4H1'_zC1'_zC2_x \cos(2\pi J_{C2'C1'}\tau) \cos(2\pi J_{C2'C3'}\tau)$ .

Die Magnetisierung wird durch einen CC-COSY Transferschritt in  $H1'C1'$  Magnetisierung und anschließend durch einen sensitivitätsgesteigerten Rücktransfer in detektierbare Inphase  $H1'$  Magnetisierung überführt.

Da bei diesem Experiment die beiden Kopplungen während einer variablen Zeitspanne entwickelt werden, ist die Relaxation während dieser Zeit nicht vernachlässigbar: Die Magnetisierung in Abhängigkeit von  $\tau$  kann beschrieben werden durch  $I(\tau) = I_0 \cos(2\pi J_{C2'C1'}\tau) \cos(2\pi J_{C2'C3'}\tau) e^{-\tau/T_2^*}$ , wobei  $T_2^*$  die apparente  $T_2$  Relaxationszeit des Operators  $4H1'_z C1'_z C2_x$  ist.

Die gezeigte Sequenz wurde auf das zuvor beschriebene RNA 14mer angewendet. 24 zweidimensionale Ebenen wurden innerhalb von 24 Stunden an einem 600 MHz Bruker Avance II Spektrometer mit cryogenem Probenkopf aufgenommen. Mit der beschriebenen Sequenz konnten für 11 der 14 Nukleotide beide Kopplungskonstanten mit einer Abweichung von weniger als 0.6 Hz bestimmt werden (siehe Abbildung 4.28).

Die Kopplungskonstanten wurden durch Angleichen der theoretischen Funktion an die experimentellen Daten ermittelt, wobei die Variablen  $I_0$ ,  $J_{C2'C1'}$ ,  $J_{C2'C3'}$  und  $T_2^*$  bestimmt wurden.

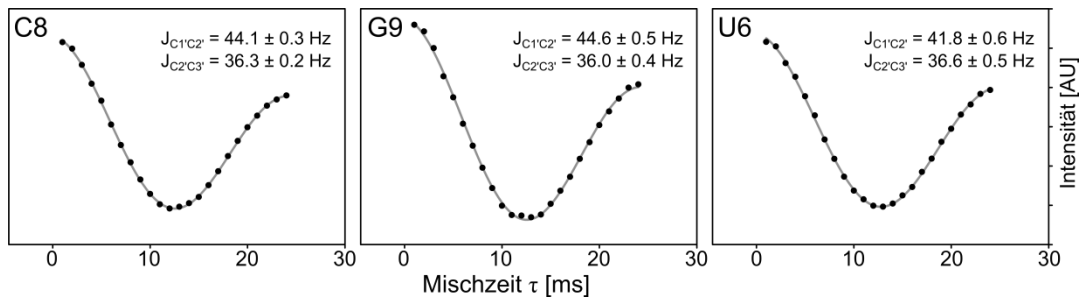


Abbildung 4.28 Experimentelle Daten (schwarze Punkte) und Fit Ergebnisse (graue Linie) des HCC-COSY Experiments zur Bestimmung von  $^1J(C2'C3')$  und  $^1J(C1'C2')$  Kopplungen. Gezeigt sind die Daten für drei Signale eines RNA 14mers.

## 4.3 RNA-Modifikationen zur Einführung von Lanthanid-Bindungsstellen

### 4.3.1 Biochemische Modifikation

Bei der Einführung von Lanthanid-Bindungsstellen in RNA gibt es im Wesentlichen zwei Probleme: RNA besitzt, analog zu anderen Metallionen, eine natürliche, wenn auch nicht sehr starke Affinität zu Lanthanidionen, die zu einer unspezifischen Bindung führt (CIESIOLKA, MARCINIEC *et al.* 1989; CIESIOLKA, WRZESINSKI *et al.* 1989). Außerdem sind Lanthanide dafür bekannt, die hydrolytische Spaltung des RNA-Rückgrates zu katalysieren (MATSUMURA und KOMIYAMA 1997).

Bei den durchgeführten Untersuchungen wurde ein GAAA *tetraloop*, aus der Familie der GNRA *loops*, an das zu untersuchende RNA 14mer angehängt. Diese Sequenzen besitzen eine Affinität zu Lanthanidionen im niedrigen micromolaren Bereich (MUNDOMA und GREENBAUM 2002; MUNDOMA und GREENBAUM 2003). Zur Stabilisierung des GAAA Loops wurden drei weitere GC-Basenpaare hinzugefügt, was in einem 24mer resultiert. Homogene Sequenzen wurden durch Verwendung eines 3' Hammerhead-Ribozyms bei der *in vitro* Transkription erzeugt (siehe Kapitel 3.2).

Wie in Abbildung 4.29 zu sehen ist, hat der zusätzliche *stemloop* kaum einen Einfluss auf die Struktur des RNA-Moleküls. Die geringen Abweichungen können zum einen durch die Stapelung des zusätzlichen Stranges, zum anderen aber auch durch leicht veränderte Bedingungen erklärt werden: Das RNA 14mer liegt in einem Phosphat-Puffer vor. Dieser wurde im Falle des 24mers, für die anschließende Zugabe von Lanthanid, durch MES-Puffer bei gleichem pH Wert ersetzt, da Lanthanidphosphate schwerlöslich sind.



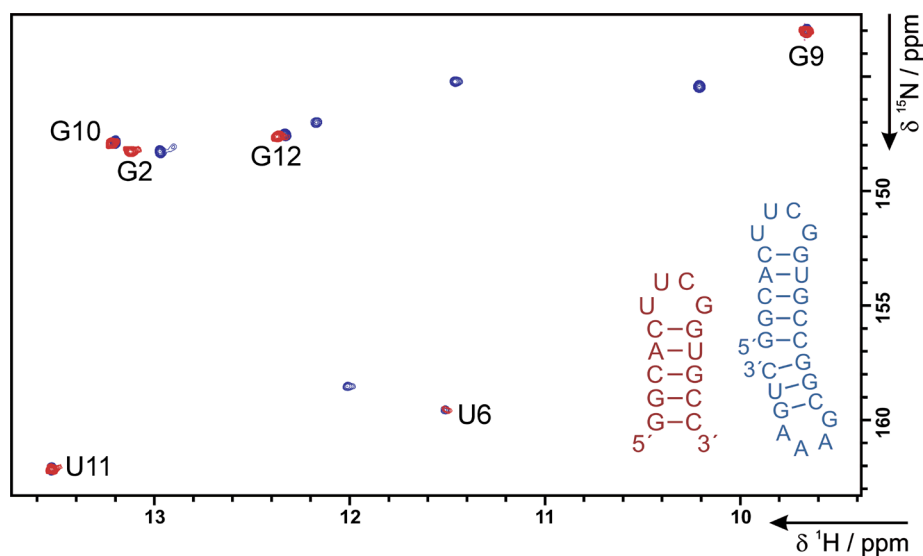


Abbildung 4.29  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$  HSQC Spektrum des bereits beschriebenen RNA 14mers ohne (rot) und mit angehängtem GAAA stemloop (blau).

Die Probe des RNA 24mers wurde in zwei Proben geteilt, wobei einer Hälfte Lutetiumchlorid als diamagnetische Referenz zugesetzt wurde. Zur anderen Hälfte wurde Thuliumchlorid als paramagnetisches Ion gegeben (siehe Abbildung 4.30).

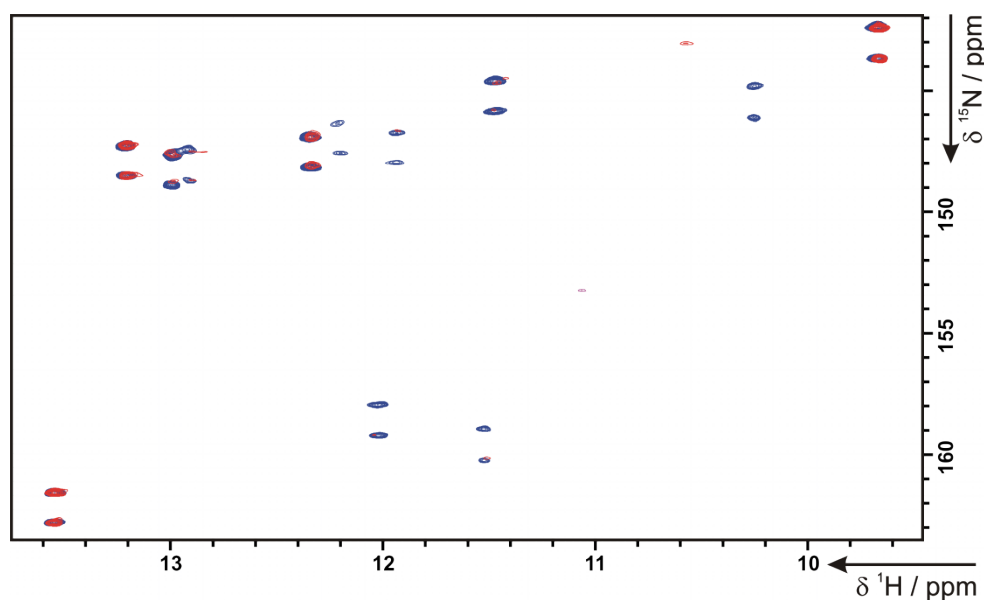


Abbildung 4.30  $t_1$ -gekoppeltes  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des oben gezeigten RNA 24mers. In blau gezeigt, ist das Spektrum nach Zugabe von 0,45 eq  $\text{TmCl}_3$ , in rot nach Zugabe von 0,9 eq  $\text{TmCl}_3$ .

Wie man am Ausbleichen der Signale in räumlicher Nähe zum gebundenen Lanthanidion bereits erkennen kann, wird dieses im Bereich des angehängten GAAA loops gebunden. Das Spektrum, das den 14mer Teil beschreibt, bleibt weitestgehend unverändert.

Beim Vergleich der Spektren nach Zugabe von 0,9 Äquivalenten Lutetium und 0,9 Äquivalenten Thulium kann man allerdings kleine dipolare Restkopplungen erkennen. Dies wird noch deutlicher, wenn man die aromatischen CH-Gruppen sowie die Zuckersignale betrachtet.

Die dipolaren Restkopplungen der Aromaten wurden durch den Vergleich des HSQC- und des TROSY-Spektrums bestimmt, wobei das TROSY-Spektrum um  $(^1J+^1D)/2$  im Vergleich zum HSQC-Spektrum verschoben ist (siehe Abbildung 4.31).

Die RDCs der Zuckersignale wurden mittels des constant-time IPAP-HSQCs gemessen (siehe Kapitel 4.2.1).

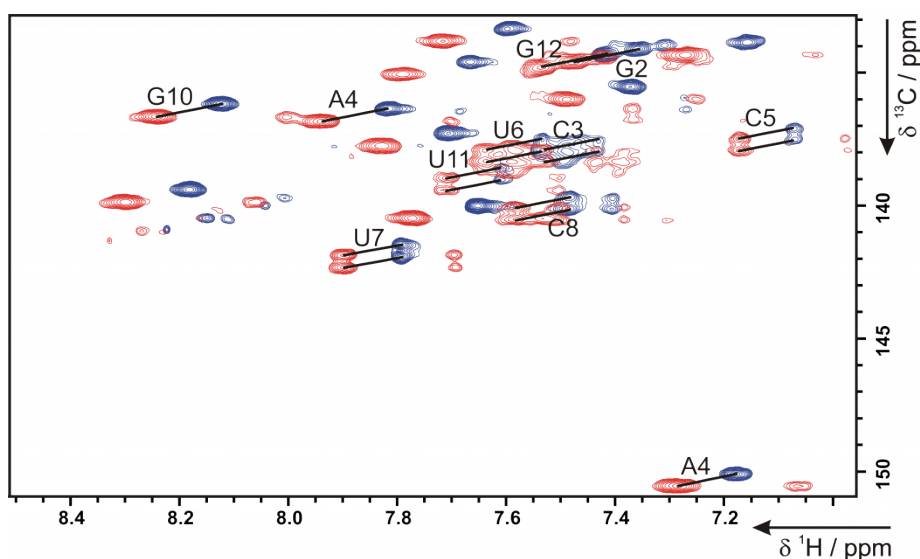


Abbildung 4.31 Überlagerung von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC und TROSY Spektrum, gemessen am beschriebenen RNA 24mer nach Zugabe von 0,9 eq Thulium. Die Aufspaltung durch die Kopplung ist in beiden Dimensionen sichtbar (angedeutet durch diagonale Linien).

Insgesamt konnten so 44 dipolare Restkopplungen bestimmt werden. Die auftretenden Werte liegen im Bereich von -4,5 bis 3 Hertz (siehe Abbildung 4.32).

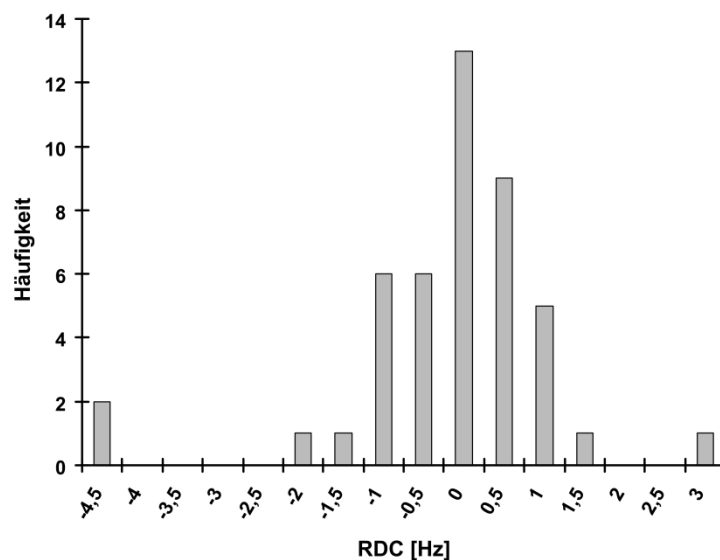


Abbildung 4.32 Verteilung der dipolaren Restkopplungen, gemessen am bereits erwähnten RNA 24mer durch Zugabe von Thulium. Die gemessenen dipolaren Restkopplungen wurden entsprechend dem gyromagnetischen Verhältnis bzw. der Bindungslänge skaliert.

Die gemessenen dipolaren Restkopplungen für den starren Teil des RNA 14mers wurden mit Hilfe des Programms PALES (ZWECKSTETTER und BAX 2000) mit der vorläufigen Struktur des RNA 14mers verglichen (NOZINOVIC, FURTIG *et al.* 2010) (siehe Abbildung 4.33). Die gemessenen Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Struktur (R-Wert der Regression 0.86).

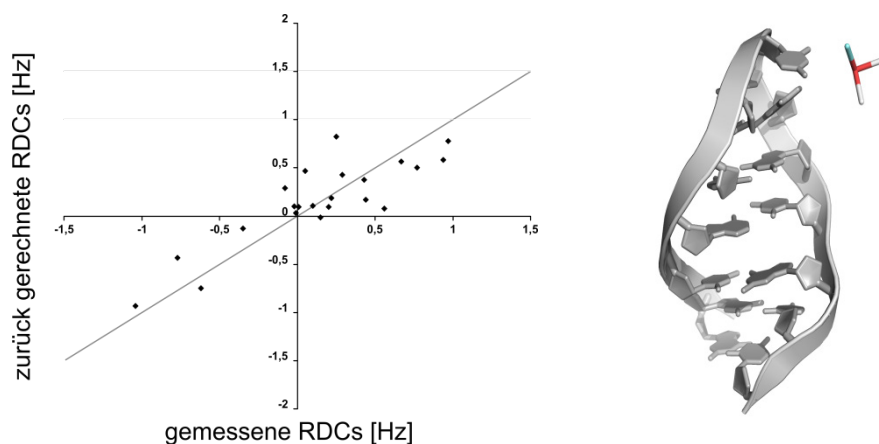


Abbildung 4.33 Vergleich von gemessenen und aus der Struktur zurück gerechneten RDCs (links) sowie die Struktur mit dem berechneten Orientierungstensor (rechts).

### 4.3.2 Chemische Modifikation

Die chemische Modifikation von *in vitro* transkribierter RNA beinhaltet mehrere Schwierigkeiten. Grundsätzlich unterscheiden sich nur die beiden Enden in ihrer chemischen Struktur und können deshalb gezielt modifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die RNA während der *in vitro* Transkription durch Zugabe von Guanosinmonothiophosphat für die spätere, chemische Modifikation am 5'-Ende vorbereitet (siehe Kapitel 3.4.2). Als Molekül für die anschließende Modifikation wurde die Aptamerdomäne des Guanin-bindenden Riboswitches (Gswitch) verwendet, die bereits NMR-spektroskopisch untersucht wurde (NOESKE, BUCK *et al.* 2007).

Durch einen fünffachen Überschuss an GMPS gegenüber GTP konnte erreicht werden, dass selektive GMPS an erster Position des RNA-Transkriptes eingebaut wird. Durch anschließende Zugabe eines Chelat-Bildners mit aktivierter Thiol-Funktionalität konnte die RNA modifiziert werden.

Die Reaktion lässt sich hierbei mittels  $^{31}\text{P}$  NMR verfolgen. Freies Guanosinmonothiophosphat hat eine Phosphor chemische Verschiebung von 43 ppm (siehe Abbildung 4.34).

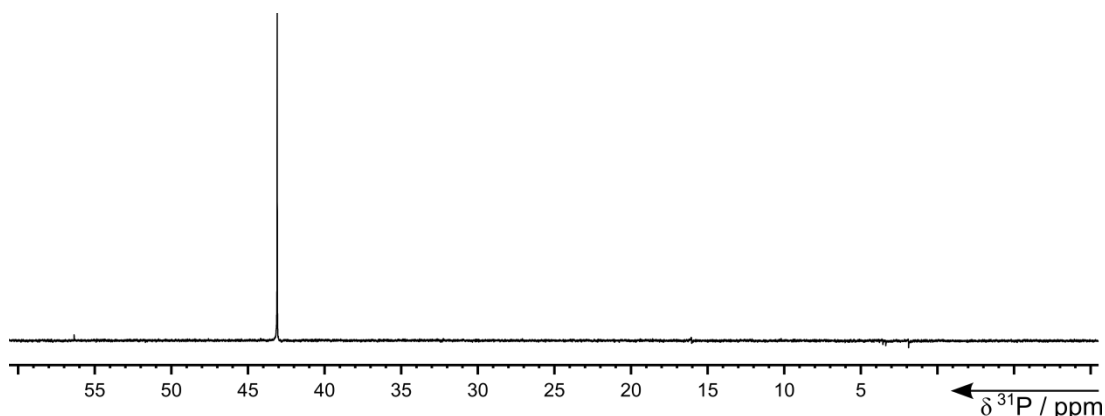


Abbildung 4.34  $^{31}\text{P}$  1D Spektrum des synthetisierten Guanosinmonothiophosphates. Das Spektrum wurde gemessen an einem 300 MHz Bruker Avance II Spektrometer, ausgerüstet mit einem BBO Probenkopf.

Bei der Modifikation bildet sich eine Disulfidbrücke, die eine 25 bis 30 ppm Hochfeldverschiebung des Phosphor-Signals zur Folge hat (BEHRMAN 2000). Die Messungen am modifizierten Gswitch zeigen kein Signal mehr bei 43 ppm, sondern ein Signal bei 20 ppm, was für die Ausbildung einer Disulfidbrücke spricht (siehe Abbildung 4.35). Außerdem sind keine Signale im Bereich -5 bis -20 zu erkennen, was darauf hindeutet, dass an erster Position kein Triphosphat eingebaut wurde.

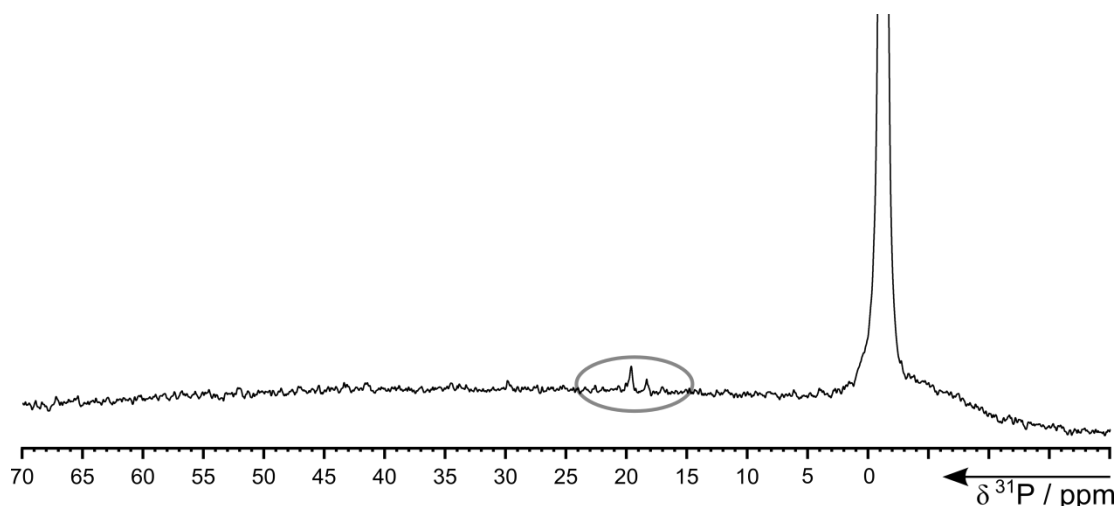


Abbildung 4.35  $^{31}\text{P}$  eindimensionales Spektrum des Guanin-bindenden Riboswitches nach der Transkription bei fünffachem Überschuss GMPS sowie Modifikation mit N-[S-(2-Pyridylthio)cysteaminyl]ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat. Das Spektrum wurde gemessen an einem 300 MHz Bruker Avance II Spektrometer, ausgerüstet mit einem BBO Probenkopf.

Die RNA wurde anschließend in zwei Proben aufgeteilt. Eine Probe wurde mit einem Äquivalent Lutetium, die andere mit einem Äquivalent Terbium beladen (siehe Abbildung 4.36).

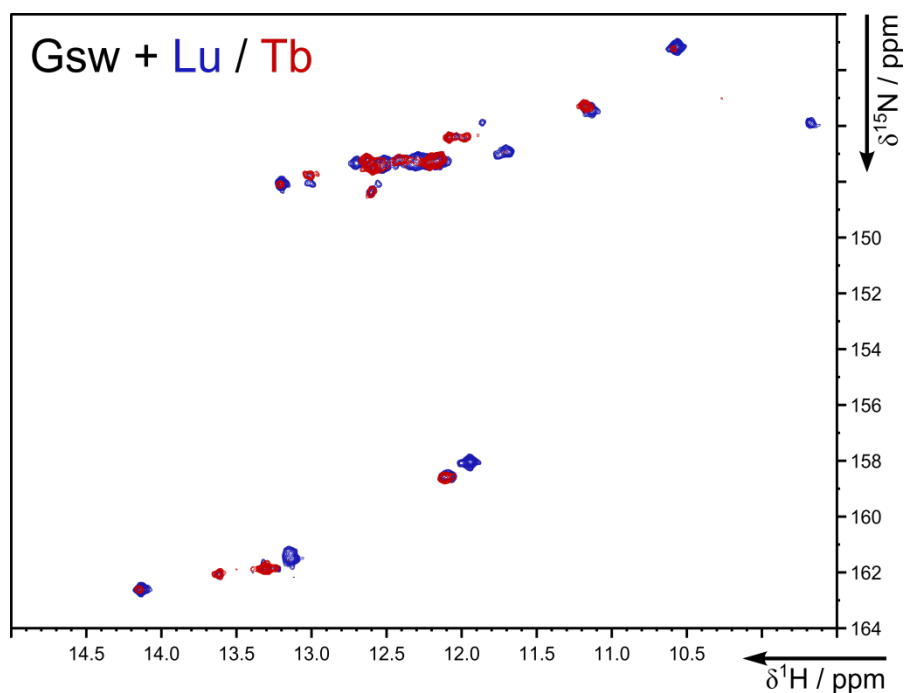


Abbildung 4.36  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des freien Gswitchs mit 5' Modifikation nach Zugabe von einem Äquivalent Lutetium bzw. Terbium.

Die Zugabe von einem Äquivalent führte bereits zur deutlichen Veränderung des Spektrums. Zwar blieben einige Signale unberührt von der Zugabe des paramagnetischen Ions, bei anderen Signalen kommt es jedoch zu deutlichen Verschiebungen bzw. zum Verlust des Signals.

Die Proben wurden daraufhin beide bis zum 1,5fachen Überschuss an Lanthanid titriert. Die Lutetium Probe zeigte hierbei keine Veränderung des Spektrums, wohingegen bei weiterer Zugabe von Terbium beinahe alle Signale verloren gehen (siehe Abbildung 4.37).

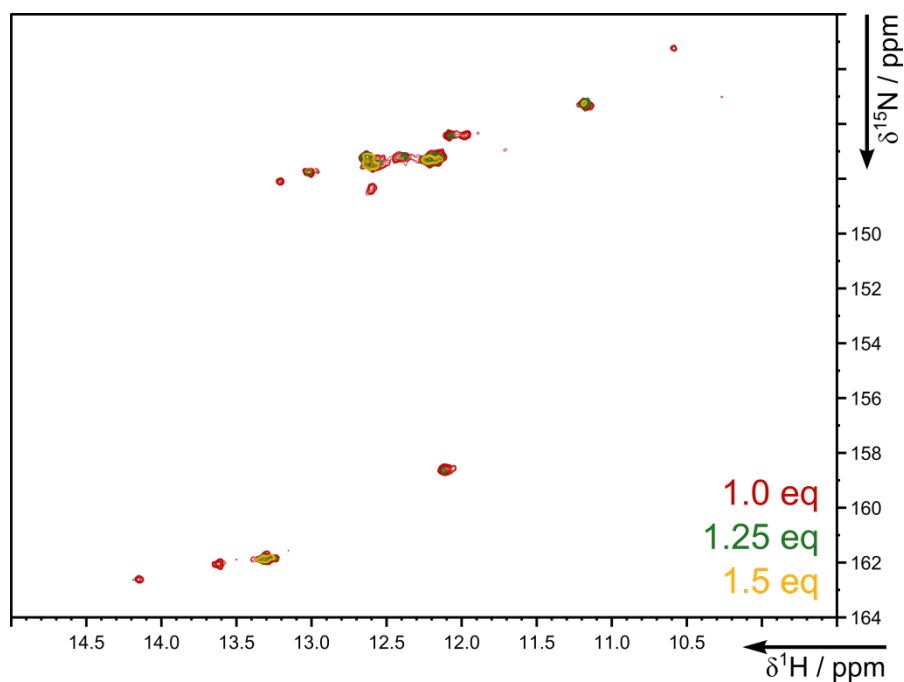


Abbildung 4.37  $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des freien Gswitchs mit 5' Modifikation nach Titration mit 1,5 Äquivalenten Terbium.

Anschließend wurden zu beiden Proben jeweils 1,3 Äquivalente Thioguanin zugesetzt. Thioguanin dient hierbei als Ersatz für den natürlichen Liganden Guanin, da dieser nur sehr schlecht in Wasser löslich ist. Beide Spektren zeigen daraufhin deutliche Veränderungen, wobei vor allem die Probe, die 1,5 Äquivalente Terbium enthielt, nun wieder eine deutlich höhere Anzahl an Signalen zeigte (siehe Abbildung 4.38).

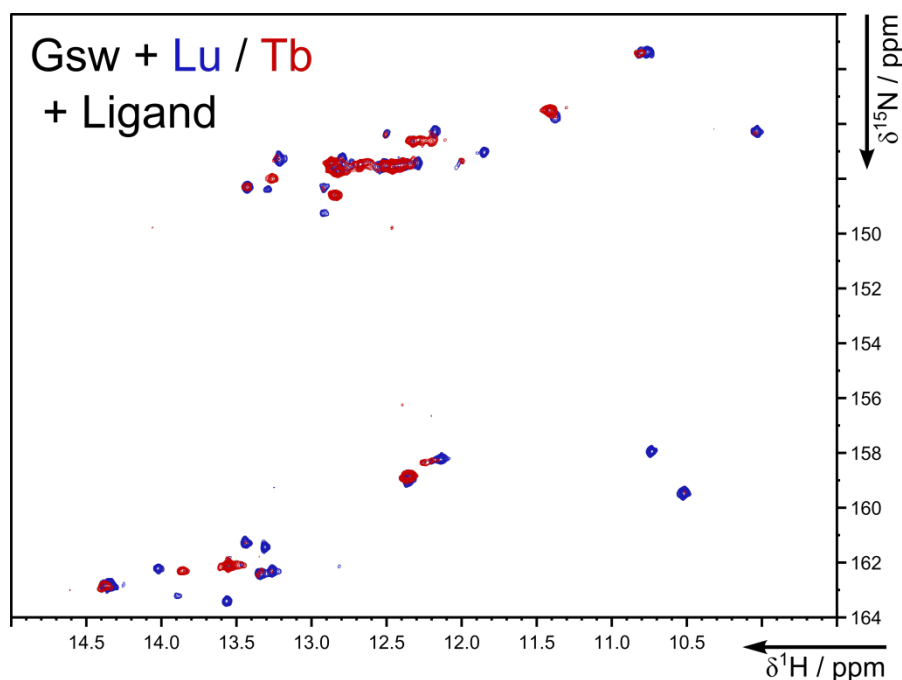


Abbildung 4.38  $^1\text{H},^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des gebundenen Gswitchs mit 5' Modifikation nach Zugabe von 1,5 Äquivalent Lutetium bzw. Terbium.

Die Zugabe von Thioguanin scheint den Einfluss des gebunden paramagnetischen Lanthanid Ions zu verändern. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die RNA im freien Zustand sehr flexibel ist und die Zugabe von Thioguanin als Ligand zur Ausbildung stabiler Tertiärstrukturen führt und damit dafür sorgt, dass sich das ganze Molekül starrer verhält (BUCK, FÜRTIG *et al.* 2007).

Für den gebundenen Zustand sieht man deutlich, dass das gebundene Lanthanid Ion einen wohl definierten Einfluss auf das Spektrum des RNA-Moleküls hat. Die auftretenden Effekte, die von der relativen Orientierung des Lanthanids zum RNA-Molekül abhängen, wie beispielsweise *pseudo contact shifts* sind sehr klein. Der Grund hierfür ist eventuell die flexible Verbindung zum angehängten Chelatbildner, der dem Lanthanidion zu viel Bewegungsspielraum lässt (siehe Kapitel 3.4.2).



#### 4.4 Konformationsbestimmung der Cylindramid Derivate

Die Struktur von Cylindramid (siehe Abbildung 4.39) wurde zuvor bereits bestimmt, was es ermöglicht Dihedralwinkel zu extrahieren (siehe Abbildung 4.41) und zu überprüfen, ob diese Winkel im Einklang mit den gemessenen NMR-spektroskopischen Daten der Derivate stehen.

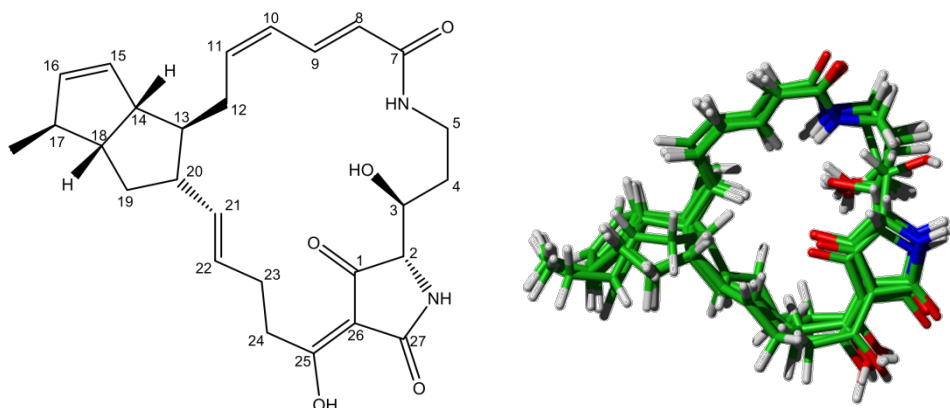


Abbildung 4.39 Strukturformel (links) und 3D-Struktur (rechts) von Cylindramid. Gezeigt sind die zehn Strukturen niedrigster Energie. Für die Strukturrechnung wurden 71 ROE Distanzinformatoren und 21 dipolare Restkopplungen verwendet (MATHIEU 2007; LASCHAT, CRAMER et al. 2008).

Die zu untersuchenden Derivate 1-4 variieren in der Konfiguration der C-Atome C2 C13 und C20 (siehe Abbildung 4.40).

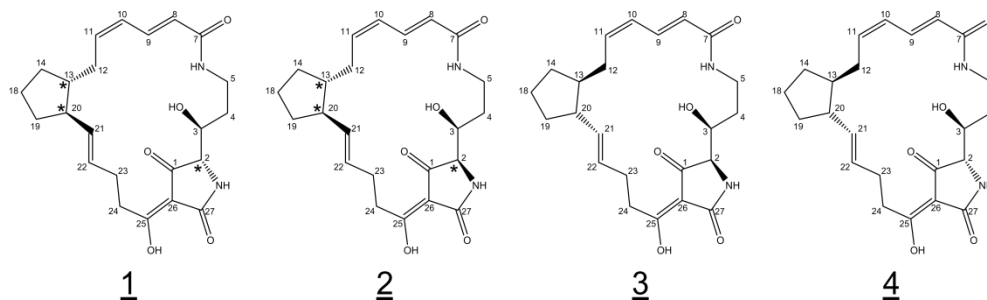


Abbildung 4.40 Strukturformeln der vier untersuchten Cylindramid-Derivate. Die Konfiguration der im Falle von 1 und 2 mit einem Stern gekennzeichneten C-Atome konnte in dieser Arbeit nicht endgültig bestimmt werden.

Für die Untersuchung werden im Folgenden die DQF-COSY Kreuzsignale betrachtet. Im Fall von Cylindramid sind die Kreuzsignale H2-H3 und H13-H20 nicht vollständig aufgelöst. Aus diesem Grund wurden die Kreuzsignale H3-H4 und H20-H21 untersucht, die die Kopplungen  $^3J(\text{H13H29})$  bzw.  $^3J(\text{H2H3})$  als passive Kopplung enthalten. Die Konformation von Cylindramid ist im Detail in Abbildung 4.41 dargestellt.

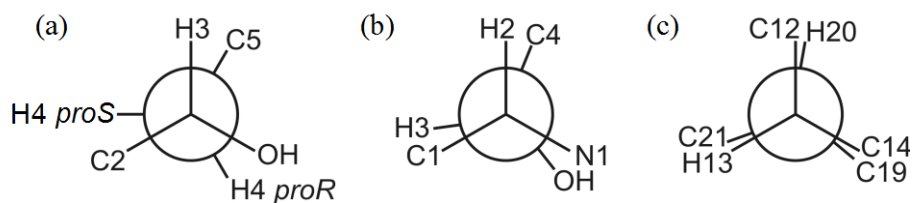


Abbildung 4.41 Newman-Projektionen entlang der C3C4-Bindung (a), C2C3-Bindung (b) und der C13C20-Bindung (c).

Bei der Betrachtung des Kreuzsignalmusters H20-H21 lassen sich direkt zwei der vier Derivate identifizieren, 1 und 4, die offensichtlich die gleiche Konfiguration besitzen, verglichen mit Cylindramid (siehe Abbildung 4.42).

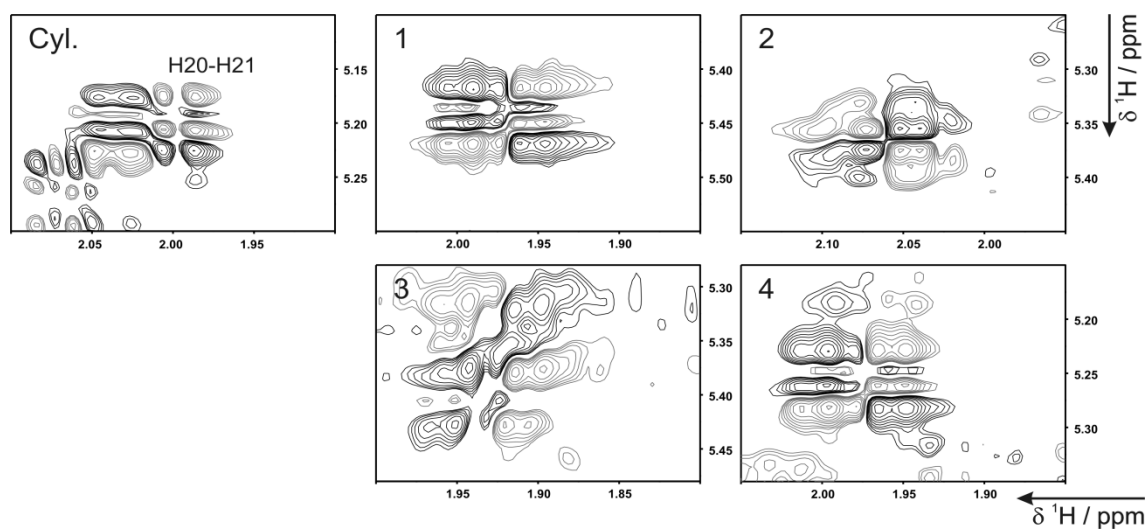


Abbildung 4.42 H20-H21 Kreuzsignal im DQF-COSY Spektrum von Cylindramid (Cyl.) und den vier untersuchten Derivaten (1-4).

Betrachtet man als nächstes das H3-H4 Kreuzsignal, so ist zunächst zu beachten, dass es zwei mögliche Kreuzsignale zu den beiden Protonen H4 proR bzw. H4 proS gibt. Die Zuordnung proR / proS wurde auf Basis der berechneten Struktur getroffen. Im Falle von Cylindramid schließen die Protonen H4 proS und H3, im Mittel der zehn Strukturen niedrigster Energie, einen Winkel von  $87^\circ$  ein, was nach der Karplus-Beziehung einer Kopplung von etwa 0 Hz entspricht. Das Kreuzsignal H3-H4 proS ist dementsprechend nicht sichtbar. Gleiches beobachtet man auch für das Derivat 4. Außerdem zeigt das Kreuzsignal H3-H4 proR des Derivates 4 das gleiche Kopplungsmuster, wie Cylindramid (siehe Abbildung 4.43).

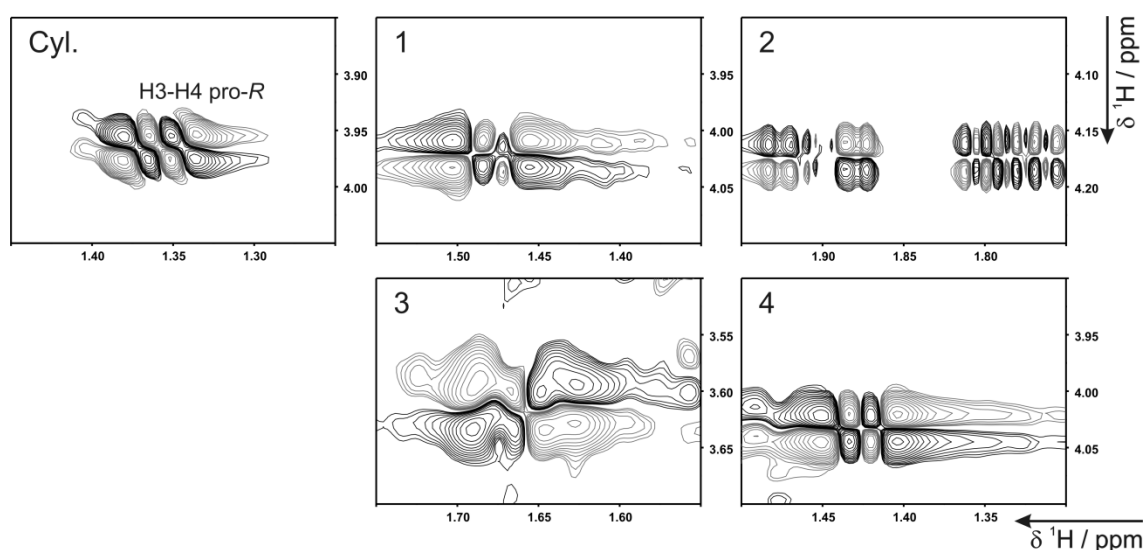


Abbildung 4.43 H3-H4 Kreuzsignal im DQF-COSY Spektrum von Cylindramid (Cyl.) und den vier untersuchten Derivaten (1-4).

Das Derivat 4 konnte demnach als dasjenige identifiziert werden, welches die gleiche Konfiguration besitzt wie Cylindramid. Diese Schlussfolgerung deckt sich außerdem mit den durchgeführten biologischen Tests. Tatsächlich zeigt das Derivat 4 eine deutlich höhere Zytotoxizität, verglichen mit den Derivaten 1 bis 3 (LASCHAT, CRAMER *et al.* 2008). Bedingt durch die Syntheseroute unterscheiden sich die Derivate 3 und 4 nur in der Konfiguration an der Position C2, wodurch auch die Konfiguration des Derivates 3 feststeht.

Die Konfiguration der Derivate 1 und 2 konnte auf Basis der gemessenen spektroskopischen Daten nicht endgültig bestimmt werden, obwohl das Derivat 1 offensichtlich die gleiche Konfiguration an C13 und C20 besitzt, verglichen mit Cylindramid. Die deutlich verringerte Aktivität legt die Vermutung nahe, dass die Struktur sich deutlich von Cylindramid unterscheidet, was einen Vergleich erschwert. In diesem Fall wäre eine vollständige Bestimmung der Struktur auf Basis von zusätzlichen NMR-Spektroskopischen Daten erforderlich. Hierauf wurde auf Grund der ohnehin verringerten Aktivität verzichtet.

Offensichtlich ist die dreidimensionale Struktur des Moleküls Cylindramid Voraussetzung für die zytotoxische Aktivität. Selbst eine deutliche strukturelle Veränderung führt im Falle des Derivates 4, mit der gleichen Konformation, nicht zum Verlust der Aktivität.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen an GXG Modellpeptiden konnten eindeutig zeigen, dass diese Peptide, auch ohne das Vorhandensein von langreichweitigen Wechselwirkungen, bestimmte Sekundärstrukturen präferieren. Ein Teil der beobachteten, auftretenden Struktur motive lässt sich hierbei über den sterischen Anspruch der Seitenkette erklären, ein anderer Teil über die Ladung der Seitenkette. In Kombination mit anderen Spektroskopischen Methoden konnten zehn dieser Peptide genauestens untersucht werden. Hierbei zeigte sich, dass diese Peptide nicht nur die favorisierten Regionen des Ramachandran-Diagramms besetzen. Ein Vergleich mit dem Vorkommen bestimmter Aminosäuren, beispielsweise in *loop* Regionen von Proteinen, zeigt dass die Sequenz dieser *loops* nicht zufällig ist. Tatsächlich besitzt ein Teil der Aminosäuren, die besonders häufig an bestimmten *loop* Positionen vorkommen, bereits die intrinsische Vorliebe, die notwendige Konformation einzunehmen. Diese Aminosäuren und die umgebenden *loops* sind somit eventuell nicht nur das simple Verbindungsglied zwischen zwei Sekundärstrukturen, sondern kommen selbst als Ausgangspunkte für Peptid- bzw. Proteinfaltung in Frage.

Ein weiteres Augenmerk der Arbeit lag auf der Messung von skalaren und dipolaren Kopplungen an isotopenmarkierter RNA. Es wurden vier Pulssequenzen entwickelt, die es ermöglichen,  $^1\text{J}$  skalare bzw. dipolare Kopplungen in der Zuckerregion von  $^{13}\text{C}$ -markierter RNA mit hoher Präzision zu messen. Die entwickelten J-modulierten Experimente ermöglichen die Messung von  $^1\text{J}(\text{H}2'\text{C}2')$ ,  $^1\text{J}(\text{C}1'\text{C}2')$  sowie  $^1\text{J}(\text{C}2'\text{C}3')$  Kopplungen selbst für größere RNA Moleküle. Die Detektion erfolgt hierbei auf den  $\text{C}1'\text{H}1'$  Signalen, die Zuordnung der Kerne, deren Kopplung gemessen wird, ist nicht einmal erforderlich. Die Anwendbarkeit konnte für verschiedene Systeme mit 14 bis 70 Nukleotiden demonstriert werden. Die erreichte Präzision ermöglichte es außerdem auch sehr kleine Effekte, wie beispielsweise die Ausrichtung von RNA im Magnetfeld zu detektieren.

Diese Arbeit zeigt außerdem zwei Beispiele für die gezielte Modifikation, um Lanthanid Bindungsstellen einführen zu können. Auf chemischen und biochemischen Weg konnte isotopenmarkierte, *in vitro* transkribierte RNA modifiziert werden. Die Ergebnisse zeigen eindeutig eine Bindung von Lanthanid-Ionen an die modifizierte RNA. Die auftretenden,

eher kleinen Effekte, sind vermutlich auf die noch zu hohe Flexibilität der eingeführten Modifikationen. Vor allem bei der chemischen Modifikation besteht hier noch Potential zur Optimierung, nachdem die generelle Anwendbarkeit der Methode demonstriert wurde.

Der letzte Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Analyse von Kopplungsmustern zur Analyse und zum Vergleichen von Naturstoffen. Hier konnten aus einer Reihe von Derivaten eindeutig die identifiziert werden, die verglichen mit der Ausgangsstruktur, die gleiche Konformation besitzen. Die gewonnenen Ergebnisse decken sich hier mit durchgeführten biologischen Tests, die ebenfalls dasselbe Derivat als aktiv identifizieren konnten, was klar für eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung spricht.

In der vorliegenden Arbeit werden Methoden und Anwendungen gezeigt, um skalare und dipolare Kopplungen im Bereich von Peptiden, Nukleinsäuren und kleinen Molekülen zu nutzen. Die durchgeführten Arbeiten reichen dabei von der speziellen Probenpräparation zur Messung von dipolaren Kopplungen bis hin zur Entwicklung neuer NMR-spektroskopischer Methoden zur Messung von Kopplungen mit höherer Präzision und an größeren Systemen als bisher.

## 6 Literaturverzeichnis

F. A. L. Anet und A. J. R. Bourn (1965). "Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects." *J. Am. Chem. Soc.* **87**(22): 5250-5251.

A. Bax, G. W. Vuister, S. Grzesiek, F. Delaglio, A. C. Wang, R. Tschudin und G. Zhu (1994). "Measurement of homo- and heteronuclear J couplings from quantitative J correlation." *Methods Enzymol.* **239**: 79-105.

M. D. Beachy, D. Chasman, R. B. Murphy, T. A. Halgren und R. A. Friesner (1997). "Accurate ab initio quantum chemical determination of the relative energetics of peptide conformations and assessment of empirical force fields." *J. Am. Chem. Soc.* **119**(25): 5908-5920.

E. J. Behrman (2000). "An improved synthesis of guanosine 5'-monothiophosphate." *J. Chem. Res.*(9): 446-447.

P. Bernado, L. Blanchard, P. Timmins, D. Marion, R. W. Ruigrok und M. Blackledge (2005). "A structural model for unfolded proteins from residual dipolar couplings and small-angle x-ray scattering." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(47): 17002-17007.

I. Bertini, M. B. Janik, Y. M. Lee, C. Luchinat und A. Rosato (2001). "Magnetic susceptibility tensor anisotropies for a lanthanide ion series in a fixed protein matrix." *J. Am. Chem. Soc.* **123**(18): 4181-4188.

R. B. Best, N. V. Buchete und G. Hummer (2008). "Are current molecular dynamics force fields too helical?" *Biophys. J.* **95**(1): L07-L09.

J. Boisbouvier, B. Brutscher, A. Pardi, D. Marion und J.-P. Simorre (2000). "NMR Determination of Sugar Puckers in Nucleic Acids from CSA-Dipolar Cross-Correlated Relaxation." *J. Am. Chem. Soc.* **122**(28): 6779-6780.

J. Boisbouvier, P. Gans, M. Blackledge, B. Brutscher und D. Marion (1999). "Long-range structural information in NMR studies of paramagnetic molecules from electron spin-nuclear spin cross-correlated relaxation." *J. Am. Chem. Soc.* **121**(33): 7700-7701.

- D. A. Brant und P. J. Flory (1965a). "Configuration of Random Polypeptide Chains .2. Theory." *J. Am. Chem. Soc.* **87**(13): 2791-2800.
- D. A. Brant und P. J. Flory (1965b). "Configuration of Random Polypeptide Chains .I. Experimental Results." *J. Am. Chem. Soc.* **87**(13): 2788-2791.
- D. L. Bryce, J. Boisbouvier und A. Bax (2004). "Experimental and theoretical determination of nucleic acid magnetic susceptibility: Importance for the study of dynamics by field-induced residual dipolar couplings." *J. Am. Chem. Soc.* **126**(35): 10820-10821.
- J. Buck, B. Fürtig, J. Noeske, J. Wöhnert und H. Schwalbe (2007). "Time-resolved NMR methods resolving ligand-induced RNA folding at atomic resolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(40): 15699-15704.
- V. F. Bystrov, Y. D. Gavrilov, V. T. Ivanov und Y. A. Ovchinnikov (1977). "Refinement of the solution conformation of valinomycin with the acid coupling constants from the  $^{13}\text{C}$ -nuclear-magnetic-resonance spectra." *Eur. J. Biochem.* **78**(1): 63-82.
- L. A. Carpino und G. Y. Han (1972). "9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino-Protecting Group." *J. Org. Chem.* **37**(22): 3404-3407.
- D. A. Case, C. Scheurer und R. Brüschweiler (2000). "Static and dynamic effects on vicinal scalar J couplings in proteins and peptides: A MD/DFT analysis." *J. Am. Chem. Soc.* **122**(42): 10390-10397.
- A. D. Chen, D. H. Wu und C. S. Johnson (1995). "Determination of the Binding Isotherm and Size of the Bovine Serum Albumin-Sodium Dodecyl-Sulfate Complex by Diffusion-Ordered 2D NMR." *J. Phys. Chem.* **99**(2): 828-834.
- K. Chen, Z. G. Liu und N. R. Kallenbach (2004). "The polyproline II conformation in short alanine peptides is noncooperative." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(43): 15352-15357.
- F. Chiti und C. M. Dobson (2009). "Amyloid formation by globular proteins under native conditions." *Nat. Chem. Biol.* **5**(1): 15-22.



- J. J. Chou, S. Gaemers, B. Howder, J. M. Louis und A. Bax (2001). "A simple apparatus for generating stretched polyacrylamide gels, yielding uniform alignment of proteins and detergent micelles." *J. Biomol. NMR* **21**(4): 377-382.
- J. Ciesiolka, T. Marciniak und W. Krzyzosiak (1989). "Probing the environment of lanthanide binding sites in yeast tRNA(Phe) by specific metal-ion-promoted cleavages." *Eur. J. Biochem.* **182**(2): 445-450.
- J. Ciesiolka, J. Wrzesinski, P. Gornicki, J. Podkowinski und W. J. Krzyzosiak (1989). "Analysis of magnesium, europium and lead binding sites in methionine initiator and elongator tRNAs by specific metal-ion-induced cleavages." *Eur. J. Biochem.* **186**(1-2): 71-77.
- N. Cramer, M. Buchweitz, S. Laschat, W. Frey, A. Baro, D. Mathieu, C. Richter und H. Schwalbe (2006). "Total synthesis and NMR investigations of cylindramide." *Chem. - Eur. J.* **12**(9): 2488-2503.
- N. Cramer, S. Laschat, A. Baro, H. Schwalbe und C. Richter (2005). "Enantioselective total synthesis of cylindramide." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **44**(5): 820-822.
- Z. Dosztanyi, J. Chen, A. K. Dunker, I. Simon und P. Tompa (2006). "Disorder and sequence repeats in hub proteins and their implications for network evolution." *J. Proteome Res.* **5**(11): 2985-2995.
- A. K. Dunker, M. Sickmeier, J. A. Hamilton, T. LeGall, V. Vacic, M. S. Cortese, A. Tantos, B. Szabo, P. Tompa, J. Chen, V. N. Uversky und Z. Obradovic (2007). "DisProt: the database of disordered proteins." *Nucleic Acids Res.* **35**: D786-D793.
- F. Eker, X. Cao, L. Nafie und R. Schweitzer-Stenner (2002). "Tripeptides adopt stable structures in water. A combined polarized visible Raman, FTIR, and VCD spectroscopy study." *J. Am. Chem. Soc.* **124**(48): 14330-14341.
- A. E. Garcia und K. Y. Sanbonmatsu (2002). "alpha-Helical stabilization by side chain shielding of backbone hydrogen bonds." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(5): 2782-2787.

- C. Gerum, K. Schlepckow und H. Schwalbe (2010). "The unfolded state of the murine prion protein and properties of single-point mutants related to human prion diseases." *J. Mol. Biol.* **401**(1): 7-12.
- J. R. Gillespie und D. Shortle (1997a). "Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. I. Paramagnetic relaxation enhancement by nitroxide spin labels." *J. Mol. Biol.* **268**(1): 158-169.
- J. R. Gillespie und D. Shortle (1997b). "Characterization of long-range structure in the denatured state of staphylococcal nuclease. II. Distance restraints from paramagnetic relaxation and calculation of an ensemble of structures." *J. Mol. Biol.* **268**(1): 170-184.
- M. Gochin und H. Roder (1995). "Protein-Structure Refinement Based on Paramagnetic NMR Shifts - Applications to Wild-Type and Mutant Forms of Cytochrome-C." *Protein Sci.* **4**(2): 296-305.
- J. Graf, P. H. Nguyen, G. Stock und H. Schwalbe (2007). "Structure and dynamics of the homologous series of alanine peptides: a joint molecular dynamics/NMR study." *J. Am. Chem. Soc.* **129**(5): 1179-1189.
- C. Griesinger, O. W. Sørensen und R. R. Ernst (1986). "Correlation of Connected Transitions by Two-Dimensional NMR-Spectroscopy." *J. Chem. Phys.* **85**(12): 6837-6852.
- S. Grzesiek und A. Bax (1992). "Improved 3D Triple-Resonance NMR Techniques Applied to a 31-KDa Protein." *J. Magn. Reson.* **96**(2): 432-440.
- A. Hagarman, T. J. Measey, D. Mathieu, H. Schwalbe und R. Schweitzer-Stenner (2010). "Intrinsic propensities of amino acid residues in GxG peptides inferred from amide I' band profiles and NMR scalar coupling constants." *J. Am. Chem. Soc.* **132**(2): 540-551.
- M. R. Hansen, L. Mueller und A. Pardi (1998). "Tunable alignment of macromolecules by filamentous phage yields dipolar coupling interactions." *Nat. Struct. Biol.* **5**(12): 1065-1074.

- J. S. Hu und A. Bax (1997). "Determination of phi and chi(1) angles in proteins from C-13-C-13 three-bond J couplings measured by three-dimensional heteronuclear NMR. How planar is the peptide bond?" *J. Am. Chem. Soc.* **119**(27): 6360-6368.
- S. Kanazawa, N. Fusetani und S. Matsunaga (1993). "Cylindramide - Cytotoxic Tetramic Acid Lactam from the Marine Sponge Halichondria-Cylindrata Tanita and Hoshino." *Tetrahedron Lett.* **34**(6): 1065-1068.
- M. Karplus (1959). "Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments." *J. Chem. Phys.* **30**(1): 11-15.
- M. Karplus (1963). "Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance." *J. Am. Chem. Soc.* **85**(18): 2870-2871.
- L. E. Kay, G. Y. Xu, A. U. Singer, D. R. Muhandiram und J. D. Forman-Kay (1993). "A Gradient-Enhanced HCCH TOCSY Experiment for Recording Side-Chain H-1 and C-13 Correlations in H<sub>2</sub>O Samples of Proteins." *J. Magn. Reson. B* **101**(3): 333-337.
- J. N. Kim, A. Roth und R. R. Breaker (2007). "Guanine riboswitch variants from *Mesoplasma florum* selectively recognize 2'-deoxyguanosine." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(41): 16092-16097.
- J. Kumar, S. Sreeramulu, T. L. Schmidt, C. Richter, J. Vonck, A. Heckel, C. Glaubitz und H. Schwalbe (2010). "Prion protein amyloid formation involves structural rearrangements in the C-terminal domain." *ChemBiochem* **11**(9): 1208-1213.
- S. Laschat, N. Cramer, S. Helbig, A. Baro, R. Diestel, F. Sasse, D. Mathieu, C. Richter, G. Kummerlöwe, B. Luy und H. Schwalbe (2008). "Synthesis and Biological Properties of Cylindramide Derivatives: Evidence for Calcium-Dependent Cytotoxicity of Tetramic Acid Lactams." *ChemBiochem* **9**(15): 2474-2486.
- L. K. Lee, M. Rance, W. J. Chazin und A. G. Palmer, 3rd (1997). "Rotational diffusion anisotropy of proteins from simultaneous analysis of <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C $\alpha$  nuclear spin relaxation." *J. Biomol. NMR* **9**(3): 287-298.

- G. Lipari und A. Szabo (1982a). "Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .1. Theory and Range of Validity." *J. Am. Chem. Soc.* **104**(17): 4546-4559.
- G. Lipari und A. Szabo (1982b). "Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic-Resonance Relaxation in Macromolecules .2. Analysis of Experimental Results." *J. Am. Chem. Soc.* **104**(17): 4559-4570.
- F. Löhr und H. Rüterjans (1995). "(H)NCAHA and (H)CANNH experiments for the determination of the vicinal coupling constants related to the phi-torsion angle." *J. Biomol. NMR* **5**(1): 25-36.
- F. Löhr und H. Rüterjans (1999). "Alternative E.COSY techniques for the measurement of  $^3J(C'_{i-1}, C_i^{\beta})$  and  $^3J(H_i^N, C_i^{\beta})$  coupling constants in proteins." *J. Biomol. NMR* **13**(3): 263-274.
- J. P. Marino, H. Schwalbe und C. Griesinger (1999). "J-coupling restraints in RNA structure determination." *Acc. Chem. Res.* **32**(7): 614-623.
- D. Mathieu (2007). Entwicklung neuer Methoden zur Messung von Residualen Dipolaren Kopplungen an Naturstoffen. *Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie*. Frankfurt a.M., Goethe Universität. **Diplomarbeit**.
- K. Matsumura und M. Komiyama (1997). "Enormously fast RNA hydrolysis by lanthanide(III) ions under physiological conditions: eminent candidates for novel tools of biotechnology." *J. Biochem.* **122**(2): 387-394.
- R. B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis .1. Synthesis of a Tetrapeptide." *J. Am. Chem. Soc.* **85**(14): 2149-2154.
- S. Mori, C. Abeygunawardana, M. O. Johnson und P. C. van Zijl (1995). "Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation." *J. Magn. Reson. B* **108**(1): 94-98.

- Y. G. Mu, D. S. Kosov und G. Stock (2003). "Conformational dynamics of trialanine in water. 2. Comparison of AMBER, CHARMM, GROMOS, and OPLS force fields to NMR and infrared experiments." *J. Phys. Chem. B* **107**(21): 5064-5073.
- C. Mundoma und N. L. Greenbaum (2002). "Sequestering of Eu(III) by a GAAA RNA tetraloop." *J. Am. Chem. Soc.* **124**(14): 3525-3532.
- C. Mundoma und N. L. Greenbaum (2003). "Binding of europium(III) ions to RNA stem loops: role of the primary hydration sphere in complex formation." *Biopolymers* **69**(1): 100-109.
- J. Noeske, J. Buck, B. Fürtig, H. R. Nasiri, H. Schwalbe und J. Wöhnert (2007). "Interplay of 'induced fit' and preorganization in the ligand induced folding of the aptamer domain of the guanine binding riboswitch." *Nucleic Acids Res.* **35**(2): 572-583.
- S. Nozinovic, B. Fürtig, H. R. Jonker, C. Richter und H. Schwalbe (2010). "High-resolution NMR structure of an RNA model system: the 14-mer cUUCGg tetraloop hairpin RNA." *Nucleic Acids Res.* **38**(2): 683-694.
- S. Nozinovic, P. Gupta, B. Fürtig, C. Richter, S. Tüllmann, E. Duchardt-Ferner, M. C. Holthausen und H. Schwalbe (2011). "Determination of the conformation of the 2'OH group in RNA by NMR spectroscopy and DFT calculations." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **50**(23): 5397-5400.
- M. Ottiger, F. Delaglio und A. Bax (1998). "Measurement of J and dipolar couplings from simplified two-dimensional NMR spectra." *J. Magn. Reson.* **131**(2): 373-378.
- G. Otting (2010). "Protein NMR Using Paramagnetic Ions." *Annu. Rev. Biophys.* **39**: 387-405.
- A. W. Overhauser (1953a). "Polarization of Nuclei in Metals." *Phys. Rev.* **91**(2): 476-476.
- A. W. Overhauser (1953b). "Polarization of Nuclei in Metals." *Phys. Rev.* **92**(2): 411-415.
- G. A. Patani und E. J. LaVoie (1996). "Bioisosterism: A Rational Approach in Drug Design." *Chem. Rev.* **96**(8): 3147-3176.

- J. H. Prestegard, C. M. Bougault und A. I. Kishore (2004). "Residual dipolar couplings in structure determination of biomolecules." *Chem. Rev.* **104**(8): 3519-3540.
- D. P. Raleigh, P. A. Evans, M. Pitkeathly und C. M. Dobson (1992). "A peptide model for proline isomerism in the unfolded state of staphylococcal nuclease." *J. Mol. Biol.* **228**(2): 338-342.
- B. Reif, A. Diener, M. Hennig, M. Maurer und C. Griesinger (2000). "Cross-correlated relaxation for the measurement of angles between tensorial interactions." *J. Magn. Reson.* **143**(1): 45-68.
- A. Rexroth, P. Schmidt, S. Szalma, O. W. Sørensen, H. Schwalbe und C. Griesinger (1995). "The DQ/ZQ-Method - a New Approach for Measuring  $^3\text{J}$ -Coupling Constants." *J. Cell. Biochem.*: 75-75.
- C. Richter, C. Griesinger, I. Felli, P. T. Cole, G. Varani und H. Schwalbe (1999). "Determination of sugar conformation in large RNA oligonucleotides from analysis of dipole-dipole cross correlated relaxation by solution NMR spectroscopy." *J. Biomol. NMR* **15**(3): 241-250.
- P. Robustelli, K. Kohlhoff, A. Cavalli und M. Vendruscolo (2010). "Using NMR chemical shifts as structural restraints in molecular dynamics simulations of proteins." *Structure* **18**(8): 923-933.
- M. Rückert und G. Otting (2000). "Alignment of Biological Macromolecules in Novel Nonionic Liquid Crystalline Media for NMR Experiments." *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 7793-7797.
- H. J. Sass, G. Musco, S. J. Stahl, P. T. Wingfield und S. Grzesiek (2000). "Solution NMR of proteins within polyacrylamide gels: Diffusional properties and residual alignment by mechanical stress or embedding of oriented purple membranes." *J. Biomol. NMR* **18**(4): 303-309.
- J. M. Schmidt (2007). "Asymmetric Karplus curves for the protein side-chain  $^3\text{J}$  couplings." *J. Biomol. NMR* **37**(4): 287-301.

- J. M. Schmidt, M. Blümel, F. Löhr und H. Rüterjans (1999). "Self-consistent  $^3J$  coupling analysis for the joint calibration of Karplus coefficients and evaluation of torsion angles." *J. Biomol. NMR* **14**(1): 1-12.
- H. Schwalbe (1993). Entwicklung neuer NMR-spektroskopischer Methoden zur Bestimmung von Kopplungskonstanten an Biomakromolekülen. *Institut für Organische Chemie*. Frankfurt, Goethe Universität. **Dissertation**.
- H. Schwalbe, T. Carlomagno, M. Hennig, J. Junker, B. Reif, C. Richter und C. Griesinger (2001). "Cross-correlated relaxation for measurement of angles between tensorial interactions." *Methods Enzymol.* **338**: 35-81.
- H. Schwalbe, M. Hennig, W. Bermel und C. Griesinger (2000). "Determination of psi torsion angle restraints from  $^3J(C^\alpha, C^\alpha)$  and  $^3J(C^\alpha, H^N)$  coupling constants in proteins." *J. Am. Chem. Soc.* **122**(26): 6268-6277.
- H. Schwalbe, J. P. Marino, S. J. Glaser und C. Griesinger (1995). "Measurement of H,H-Coupling Constants Associated with Nu-1, Nu-2, and Nu-3 in Uniformly C-13-Labeled RNA by HCC-TOCSY-CCH-E.COSY." *J. Am. Chem. Soc.* **117**(27): 7251-7252.
- H. Schwalbe, J. P. Marino, G. C. King, R. Wechselberger, W. Bermel und C. Griesinger (1994). "Determination of a Complete Set of Coupling-Constants in C-13-Labeled Oligonucleotides." *J. Biomol. NMR* **4**(5): 631-644.
- H. Schwalbe, C. Richter, B. Reif und C. Griesinger (2000). "NMR spectroscopic determination of angles alpha and delta in RNA from CH-dipolar coupling, P-CSA cross-correlated relaxation." *J. Am. Chem. Soc.* **122**(51): 12728-12731.
- H. Schwalbe, C. Richter, B. Reif, K. Wörner, S. Quant, J. P. Marino, J. W. Engels und C. Griesinger (1998). "A new experiment for the measurement of  $(n)J(C,P)$  coupling constants including  $(^3)J(C4(i'),P-i)$  and  $(^3)J(C4(i'),P_i+1)$  in oligonucleotides." *J. Biomol. NMR* **12**(2): 223-230.

- R. Schweitzer-Stenner (2009). "Distribution of conformations sampled by the central amino acid residue in tripeptides inferred from amide I band profiles and NMR scalar coupling constants." *J. Phys. Chem. B* **113**(9): 2922-2932.
- R. Schweitzer-Stenner, A. Hagarman, D. Mathieu, S. Toal, T. J. Measey und H. Schwalbe (2011). "Amino Acids with Hydrogen-Bonding Side Chains have an Intrinsic Tendency to Sample Various Turn Conformations in Aqueous Solution." *Chem. - Eur. J.* **17**(24): 6789-6797.
- R. Schweitzer-Stenner, A. Hagarman, T. J. Measey, D. Mathieu und H. Schwalbe (2010). "Intrinsic Propensities of Amino Acid Residues in GxG Peptides Inferred from Amide I ' Band Profiles and NMR Scalar Coupling Constants." *J. Am. Chem. Soc.* **132**(2): 540-551.
- Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu und A. Bax (2009). "TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts." *J. Biomol. NMR* **44**(4): 213-223.
- Y. Shen, R. Vernon, D. Baker und A. Bax (2009). "De novo protein structure generation from incomplete chemical shift assignments." *J. Biomol. NMR* **43**(2): 63-78.
- Z. S. Shi, C. A. Olson, G. D. Rose, R. L. Baldwin und N. R. Kallenbach (2002). "Polyproline II structure in a sequence of seven alanine residues." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**(14): 9190-9195.
- S. B. Shuker, P. J. Hajduk, R. P. Meadows und S. W. Fesik (1996). "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." *Science* **274**(5292): 1531-1534.
- V. Sklenar, R. D. Peterson, M. R. Rejante und J. Feigon (1993). "2-Dimensional and 3-Dimensional HCN Experiments for Correlating Base and Sugar Resonances in N-15,C-13-Labeled RNA Oligonucleotides." *J. Biomol. NMR* **3**(6): 721-727.
- L. J. Smith, K. M. Fiebig, H. Schwalbe und C. M. Dobson (1996). "The concept of a random coil. Residual structure in peptides and denatured proteins." *Fold. Des.* **1**(5): R95-106.



- X. C. Su und G. Otting (2010). "Paramagnetic labelling of proteins and oligonucleotides for NMR." *J. Biomol. NMR* **46**(1): 101-112.
- G. G. Tartaglia, A. P. Pawar, S. Campioni, C. M. Dobson, F. Chiti und M. Vendruscolo (2008). "Prediction of aggregation-prone regions in structured proteins." *J. Mol. Biol.* **380**(2): 425-436.
- M. L. Tiffany und S. Krimm (1968). "New chain conformations of poly(glutamic acid) and polylysine." *Biopolymers* **6**(9): 1379-1382.
- N. Tjandra und A. Bax (1997). "Direct measurement of distances and angles in biomolecules by NMR in a dilute liquid crystalline medium." *Science* **278**(5340): 1111-1114.
- J. R. Tolman, J. M. Flanagan, M. A. Kennedy und J. H. Prestegard (1995). "Nuclear Magnetic Dipole Interactions in Field-Oriented Proteins - Information for Structure Determination in Solution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(20): 9279-9283.
- H. T. Tran, X. Wang und R. V. Pappu (2005). "Reconciling observations of sequence-specific conformational propensities with the generic polymeric behavior of denatured proteins." *Biochemistry* **44**(34): 11369-11380.
- R. Tycko, F. J. Blanco und Y. Ishii (2000). "Alignment of biopolymers in strained gels: A new way to create detectable dipole-dipole couplings in high-resolution biomolecular NMR." *J. Am. Chem. Soc.* **122**(38): 9340-9341.
- G. W. Vuister und A. Bax (1993). "Quantitative J Correlation - a New Approach for Measuring Homonuclear 3-Bond  $J(\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha})$  Coupling-Constants in N-15-Enriched Proteins." *J. Am. Chem. Soc.* **115**(17): 7772-7777.
- A. Wacker, J. Buck, D. Mathieu, C. Richter, J. Wöhnert und H. Schwalbe (2011). "Structure and dynamics of the deoxyguanosine-sensing riboswitch studied by NMR-spectroscopy." *Nucleic Acids Res.* **39**(15): 6802-6812.

- A. C. Wang und A. Bax (1995). "Reparametrization of the Karplus Relation for  $^3J(\text{H}^\alpha\text{-N})$  and  $^3J(\text{H}^\text{N}\text{-C}')$  in Peptides from Uniformly C-13/N-15-Enriched Human Ubiquitin." *J. Am. Chem. Soc.* **117**(6): 1810-1813.
- R. Weisemann, H. Rüterjans, H. Schwalbe, J. Schleucher, W. Bermel und C. Griesinger (1994). "Determination of  $\text{H}^\text{N}$ ,  $\text{H}^\alpha$  and  $\text{H}^\text{N}$ , C' Coupling-Constants in C-13,N-15-Labeled Proteins." *J. Biomol. NMR* **4**(2): 231-240.
- J. Wirmer, C. Schlörb und H. Schwalbe (2008). Conformation and Dynamics of Nonnative States of Proteins studied by NMR Spectroscopy. *Protein Folding Handbook*. J. Buchner and T. Kiefhaber. Weinheim, WILEY-VCH. **2**: 737-808.
- J. Wirmer und H. Schwalbe (2002). "Angular dependence of  $^1J(\text{N}_i, \text{C}_i^\alpha)$  and  $^2J(\text{N}_i, \text{C}_{i-1}^\alpha)$  coupling constants measured in J-modulated HSQCs." *J. Biomol. NMR* **23**(1): 47-55.
- D. S. Wishart und A. M. Nip (1998). "Protein chemical shift analysis: a practical guide." *Biochem. Cell. Biol.* **76**(2-3): 153-163.
- D. S. Wishart, B. D. Sykes und F. M. Richards (1991). "Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure." *J. Mol. Biol.* **222**(2): 311-333.
- S. Woutersen und P. Hamm (2000). "Structure determination of trialanine in water using polarization sensitive two-dimensional vibrational spectroscopy." *J. Phys. Chem. B* **104**(47): 11316-11320.
- C. W. Wu, P. S. Eder, V. Gopalan und E. J. Behrman (2001). "Kinetics of coupling reactions that generate monothiophosphate disulfides: Implications for modification of RNAs." *Bioconjugate Chem.* **12**(6): 842-844.
- D. H. Wu und C. S. Johnson (1995). "Diffusion-Ordered 2D NMR in the Fringe-Field of a Superconducting Magnet." *J. Magn. Reson. A* **116**(2): 270-272.

Q. Zhang, A. C. Stelzer, C. K. Fisher und H. M. Al-Hashimi (2007). "Visualizing spatially correlated dynamics that directs RNA conformational transitions." *Nature* **450**(7173): 1263-1267.

Q. Zhang, X. Sun, E. D. Watt und H. M. Al-Hashimi (2006). "Resolving the motional modes that code for RNA adaptation." *Science* **311**(5761): 653-656.

M. Zweckstetter und A. Bax (2000). "Prediction of sterically induced alignment in a dilute liquid crystalline phase: Aid to protein structure determination by NMR." *J. Am. Chem. Soc.* **122**(15): 3791-3792.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| COSY               | <i>Correlation Spectroscopy</i>                |
| CSA                | Anisotropie der chemischen Verschiebung        |
| ddH <sub>2</sub> O | zweifach destilliertes Wasser                  |
| dATP               | Desoxyadenosintriphosphat                      |
| dCTP               | Desoxycytidintriphosphat                       |
| DEPC               | Diethylpyrocarbonat                            |
| dGTP               | Desoxyguanosintriphosphat                      |
| DIEA               | Diisopropylethylmin                            |
| DMF                | N,N-Dimethylformamid                           |
| DNA                | Desoxyribonukleinsäure                         |
| DQF-COSY           | Doppelquantengefiltertes COSY                  |
| dTTP               | Desoxythymidintriphosphat                      |
| EDT                | Ethandithiol                                   |
| EDTA               | Ethylendiamintetraacetat                       |
| eq                 | Äquivalente                                    |
| ESI-MS             | Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie |
| E.COSY             | <i>exclusive</i> COSY                          |
| Fmoc               | Fluorenylmethoxycarbonyl                       |

---

|       |   |
|-------|---|
| HH    | Hammerhead-Ribozym  |
| HSQC  | <i>Heteronuklear Single Quantum Correlation</i>                           |
| HBTU  | 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium<br>hexafluorophosphat |
| HOBT  | N-Hydroxybenzotriazol   |
| HPLC  | Hochdruck Flüssigkeitschromatographie                                     |
| IPAP  | inphase / antiphase   |
| IUP   | Intrinsisch unstrukturiertes Protein                                      |
| LB    | <i>lysogeny broth</i> (Nährmedium)  |
| MES   | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure  |
| MTBE  | Methyl-tertiär-butyl-ether  |
| NMR   | Kernmagnetische Resonanz  |
| NOE   | Kern-Overhauser-Effekt  |
| NOESY | <i>Nuclear Overhauser and Exchange Spectroscopy</i>                       |
| PAGE  | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| RNA   | Ribonukleinsäure  |
| RP    | Umkehrphase ( <i>reversed phase</i> )                                     |
| RDC   | Dipolare Restkopplung ( <i>residual dipolar coupling</i> )                |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion   |
| PCS   | <i>pseudo contact shift</i>   |
| PRE   | <i>paramagnetic relaxation enhancement</i>                                |

|      |   |
|------|---|
| TAE  | TRIS / Acetat / EDTA                          |
| TBE  | TRIS /Borat / EDTA                            |
| TFA  | Trifluoressigsäure                            |
| TIS  | Triisopropylsilan                             |
| TRIS | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan               |
| TPPI | <i>time proportional phase incrementation</i> |
| V    | Volt  |

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| Abbildung 1.1  | NOE Kontakte innerhalb einer $\alpha$ -Helix (A) und eines antiparallelen $\beta$ -Faltblattes (B).....  | 4  |
| Abbildung 1.2  | Karplus Kurven für den Protein Rückgrat Winkel $\phi$ .....  | 6  |
| Abbildung 1.3  | Exemplarischer Bindungsvektor im Molekülkoordinatensystem .....  | 7  |
| Abbildung 1.4  | 1D Spektrum eines Peptides .....   | 10 |
| Abbildung 1.5  | $\omega_1$ -gekoppeltes $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC eines 7mer Peptides.....   | 10 |
| Abbildung 1.6  | IPAP Experiment.....   | 11 |
| Abbildung 1.7  | E.COSY Kreuzpeakmuster als Überlagerung des inphase und antiphase Kopplungsmusters. ....   | 12 |
| Abbildung 1.8  | Prinzip des Doppelquanten-/Nullquanten Experiments. ....   | 12 |
| Abbildung 1.9  | $\text{H}^{\text{N}}\text{H}^{\alpha}$ Experiment am Beispiel des Peptides $\text{Ala}_6$ .....  | 13 |
| Abbildung 1.10 | Abhängigkeit der Intensitäten bei quantitativer J Korrelation .....  | 14 |
| Abbildung 1.11 | Intensitätsverlauf eines J-modulierten $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ HSQC Spektrums zur Bestimmung von $^1\text{J}(\text{NC}^{\alpha})$ und $^2\text{J}(\text{NC}^{\alpha})$ ..... | 15 |
| Abbildung 1.12 | RNA Rückgratwinkel gezeigt für einen einzelnen RNA Baustein. ....  | 22 |
| Abbildung 1.13 | C3' und C2' endo Konformation. ....  | 23 |
| Abbildung 1.14 | Strukturformel von Cylindramid. ....   | 24 |
| Abbildung 1.15 | Cylindramid Derivate.....  | 25 |
| Abbildung 3.1  | Schema der Fmoc Festphasensynthese von Peptiden. ....  | 28 |
| Abbildung 3.2  | Kupplung der ersten Aminosäure and 2-Chlor-Tritylharz. ....  | 29 |

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| Abbildung 3.3  | Schematische Darstellung des Gens für die anschließende in vitro RNA Synthese.....  | 32 |
| Abbildung 3.4  | Denaturierendes Polyacrylamidgel einer Reihe von Testtranskriptionen zur Optimierung der Magnesiumkonzentration. ....       | 38 |
| Abbildung 3.5  | Präparatives Polyacrylamidgel zur Aufreinigung einer transkribierten 76mer RNA, sichtbar gemacht mittels UV shadowing. .... | 40 |
| Abbildung 4.1  | Ausschnitt des Protonen 1D Spektrums von GCG.....   | 47 |
| Abbildung 4.2  | <sup>15</sup> N-HSQC Spektrum von GCG .....   | 47 |
| Abbildung 4.3  | 2D H(N)CO Spektrum von GCG .....  | 48 |
| Abbildung 4.4  | 2D H(N)CA Spektrum von GCG.....   | 49 |
| Abbildung 4.5  | 1D Spektrum von GCG.....  | 50 |
| Abbildung 4.6  | Intensitätsverlauf des J-modulierten <sup>15</sup> N-HSQC.....  | 51 |
| Abbildung 4.7  | 2D H(N)CO[Ca]-E.COSY gemessen an GCG.....   | 52 |
| Abbildung 4.8  | Auswertung des E.COSY Kopplungsmusters.....   | 52 |
| Abbildung 4.9  | 2D soft-H(N)CA-COSY gemessen an GCG.....  | 53 |
| Abbildung 4.10 | C'-gekoppeltes 2D (H)N(Ca)Ha Experiment gemessen an GCG .....   | 54 |
| Abbildung 4.11 | Ausschnitt aus dem 2D H(N)Hb[Ca]-E.COSY Experiment gemessen an GCG.....   | 54 |
| Abbildung 4.12 | Sekundärstrukturelemente gezeigt für eine kurze Peptidkette. ....   | 56 |
| Abbildung 4.13 | Karpluskurven für den Winkel $\phi$ .....   | 57 |
| Abbildung 4.14 | Karpluskurven für den Winkel $\psi$ .....   | 58 |
| Abbildung 4.15 | Pulssequenz des sensitivitätsgesteigerten constant-time IPAP HSQC.....  | 62 |



|                |   |    |
|----------------|---|----|
| Abbildung 4.16 | $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ sensitivitätsgesteigertes constant-time IPAP HSQC gezeigt für die Zuckerregion (C1'-C4') einer 24mer RNA.....  | 63 |
| Abbildung 4.17 | Constant-time HCCH-COSY Experiment.....   | 65 |
| Abbildung 4.18 | Constant-time HCCH-COSY Spektrum einer 14mer RNA .....  | 66 |
| Abbildung 4.19 | Sekundärstruktur des untersuchten RNA 14mers sowie die gemessenen $^1\text{J}(\text{C2}'\text{H2}')$ Kopplungskonstanten .....  | 67 |
| Abbildung 4.20 | Semi Constant-time HCCH-COSY Experiment .....   | 67 |
| Abbildung 4.21 | Semi constant-time HCCH-COSY und constant-time HCCH-COSY Experiment im Vergleich. ....  | 68 |
| Abbildung 4.22 | Constant-time HCCH-COSY Spektrum, gemessen an einem an einem RNA 37mer .....  | 69 |
| Abbildung 4.23 | Dipolare Restkopplungen gemessen für die Selbstausrichtung im Magnetfeld an einem RNA 37mer.....  | 70 |
| Abbildung 4.24 | Constant-time HCCH-COSY gemessen an einem RNA 70mer. ....   | 71 |
| Abbildung 4.25 | Fit von experimentellen Daten und der theoretischen Funktion $I(\tau) = I_0 \sin(\pi J_{\text{C2}'\text{H2}'} \tau)$ .....  | 71 |
| Abbildung 4.26 | Sekundärstruktur der Aptamerdomäne des 2-Deoxyguanosin bindenden Riboswitches aus mesoplasma florum und die gemessenen $^1\text{J}(\text{C2}'\text{H2}')$ Kopplungskonstanten. .... | 72 |
| Abbildung 4.27 | HCC-COSY Experiment zur simultanen, J-modulierten Messung von $^1\text{J}(\text{C1}'\text{C2}')$ und $^1\text{J}(\text{C2}'\text{C3}')$ .....                                       | 73 |
| Abbildung 4.28 | Experimentelle Daten und Fit Ergebnisse des HCC COSY Experiments zur Bestimmung von $^1\text{J}(\text{C2}'\text{C3}')$ und $^1\text{J}(\text{C1}'\text{C2}')$ Kopplungen.....       | 74 |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| Abbildung 4.29 | $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ HSQC Spektrum des bereits beschriebenen RNA 14mers ohne (rot) und mit angehängtem GAAA stemloop (blau). ....          | 76 |
| Abbildung 4.30 | $t_1$ -gekoppeltes $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des RNA 24mers .....  | 76 |
| Abbildung 4.31 | Überlagerung von $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC und TROSY Spektrum, gemessen am beschriebenen RNA 24mer.....                                    | 77 |
| Abbildung 4.32 | Verteilung der dipolaren Restkopplungen, gemessen am bereits erwähnten RNA 24mer .....   | 78 |
| Abbildung 4.33 | Vergleich von gemessenen und aus der Struktur zurück gerechneten RDCs sowie die Struktur mit dem berechneten Orientierungstensor .....               | 78 |
| Abbildung 4.34 | $^{31}\text{P}$ 1D Spektrum des synthetisierten Guanosinmonothiophosphates .....   | 79 |
| Abbildung 4.35 | $^{31}\text{P}$ eindimensionales Spektrum des Guanin-bindenden Riboswitches nach der GMPS Transkription sowie Modifikation .....                     | 80 |
| Abbildung 4.36 | $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des freien Gswitchs mit 5' Modifikation nach Zugabe von einem Äquivalent Lutetium bzw. Terbium. ....   | 81 |
| Abbildung 4.37 | $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des freien Gswitchs mit 5' Modifikation nach Titration mit 1,5 Äquivalenten Terbium.....               | 82 |
| Abbildung 4.38 | $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des gebundenen Gswitchs mit 5' Modifikation nach Zugabe von 1,5 Äquivalent Lutetium bzw. Terbium. .... | 83 |
| Abbildung 4.39 | Strukturformel und 3D-Struktur von Cylindramid .....   | 84 |
| Abbildung 4.40 | Strukturformeln der vier untersuchten Cylindramid-Derivate.....  | 84 |
| Abbildung 4.41 | Newman-Projektionen entlang der C3-C4-Bindung, C2-C3-Bindung und der C13-C20-Bindung. ....   | 85 |
| Abbildung 4.42 | H20-H21 Kreuzsignal im DQF-COSY Spektrum von Cylindramid (Cyl.) und den vier untersuchten Derivaten (1-4). ....                                      | 85 |

|                |  |    |
|----------------|--|----|
| Abbildung 4.43 | H3-H4 Kreuzsignal im DQF-COSY Spektrum von Cylindramid (Cyl.) und<br>den vier untersuchten Derivaten (1-4). .... | 86 |
|----------------|--|----|

## 7.3 Pulssequenzen

### 7.3.1 Das constant-time IPAP HSQC Experiment

```
;hsqcctetgpiasp
;
;Constant-time IPAP HSQC for measurement of 1J(CH)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
prosol relations=<triple>
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d12=20u"
```

```
"d0=3u"
"d20=d23-p16-d16-p4/2"
"d24=1s/(cnst2*cnst11)"
```

```
"in0=infl/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"DELTA1=d4-larger(p2,p8)/2-p16-8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p8)/2-4u"
"DELTA3=d23-d0-p4/2-p22-4u"
"DELTA4=d24-p19-d16"
"DELTA5=d24-p19-d16-p1"
```

```
"l0=1"
```

```
"spofff13=0"
```

```
1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
  DELTA2 p10:f2
  4u
  (center (p2 ph1) (p8:sp13 ph6):f2 )
```

```

4u
DELTA2 p12:f2 UNBLKGRAD
(p28 ph1)
4u
(p1 ph2)

p16:gp3
d16

if "10 %2 == 1"
{
(p2 ph1)
(p3 ph3):f2
p19:gp4
d16
DELTA4
(p4 ph1):f2
DELTA4
p19:gp4
d16
}
else
{
(p3 ph7):f2
p19:gp4
d16
DELTA4
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA5
p19:gp4
d16
(p1 ph1)
}

d0
(p22 ph1):f3
4u
DELTA3
(p4 ph4):f2
d20
p16:gp1*EA*-1
d16
(ralign (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
4u
DELTA2 p10:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
4u
p16:gp2
DELTA1 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1EA(igrad EA, id0 & dd20 & ip3*2 & ip7*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=0

```

```

ph7=3 1
ph31=0 2 0 2 2 0 2 0

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (off resonance)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (adiabatic)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
(adiabatic)
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20 : = d23
;d23: d23 = T : 13.3 or 26.6 msec
; 2T (constant time period) = n/J(CC)
;cnst2: = J(XH)
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;in20: = in0
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 32
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 80 : 20.1 for C-13
; 80 : 8.1 for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

```

### 7.3.2 Das sensitivitätsgesteigerte constant-time IPAP HSQC Experiment

```
;hsqcctetgpiasisp
;
;Constant-time IPAP HSQC for measurement of 1J(CH)
;using sensitivity Improvement
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
prosol relations=<triple>
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d12=20u"
```

```
"d0=3u"
"d20=d23-p16-d16-p4/2-d4"
```

```
"in0=inf1/2"
```

```
"in20=in0"
```

```
"DELTA1=p16+d16+8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p8)/2-4u"
"DELTA3=d23-d0-p4/2-p22-4u-d4"
"DELTA4=larger(p2,p4)/2+d4"
```

```
"spofff13=0"
```

```
"l0=1"
```

```
1 ze
  d11 p112:f2
2 d1 do:f2
3 (p1 ph1)
  DELTA2 p10:f2
  4u
  (center (p2 ph1) (p8:sp13 ph6):f2 )
  4u
  DELTA2 p12:f2 UNBLKGRAD
  (p1 ph8)
  4u
```

```

p16:gp3
d16
if "l0 %2 == 1"
{
(p3 ph3):f2
d0
(p22 ph1):f3
4u
DELTA3
DELTA4
(p4 ph4):f2
DELTA4
d20
p16:gp1*EA*-1
d16
}
else
{
(p3 ph9):f2
d4
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d4
d0
(p22 ph1):f3
4u
DELTA3
(p4 ph4):f2
d20
p16:gp1*EA*-1
d16
}
(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
d24
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d24
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
4u
DELTA2 p10:f2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
4u
DELTA2
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
4u
p16:gp2
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
go=2 ph31 cpd2:f2
d1 do:f2 mc #0 to 2
F1I(iu0, 2)
F1EA(igrad EA & ip5*2, id0 & dd20 & ip3*2 & ip6*2 & ip9*2 &
ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0

```



```

ph7=0 0 2 2
ph8=1 3
ph9=1 3
ph31=0 0 2 2

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (off resonance)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (adiabatic)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
(adiabatic)
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20 : = d23
;d23: d23 = T : 13.3 or 26.6 msec
; 2T (constant time period) = n/J(CC)
;d24: 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;cnst2: = J(XH)
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;inf1: 1/SW(X) = 2 * DW(X)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;in20: = in0
;nd0: 2
;NS: 4 * n
;DS: 32
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2
; 80 : 20.1 for C-13
; 80 : 8.1 for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 20.1% for C-13, 8.1% for N-15

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

```

### 7.3.3 Das J-modulierte constant-time HCCH-COSY Experiment

```

;na_hcccosygpjh3dsi
;pseudo 3D for the J modulated measurement of J(H2'C2')
;
;      F1(H2') -> F2(C2') -> F2(C1',t1) -> F1(H1',t2)
;
;phase sensitive
;using constant-time in t1
;with decoupling during acquisition
;
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p20=250u"
"d10=3u"
"d11=30m"
"d13=4u"
"d4=1s/cnst2*4"
"d5=1s/cnst3*4"

"DELTA=d5-4u"
"DELTA1=d23/2-p4/2"
"DELTA2=d23-p4/2-p2-p22-d10-d5-p16-d16"
"DELTA3=d5-p19-d16"
"DELTA4=d5-larger(p2,p4)/2-p19-d16"
"DELTA5=p20+d16+8u"

"in10=inf2/2"
"d30=d23-p4/2"
"in30=in10"

aqseq 312

1 ze
  d11 p112:f2 st0
2 d11 do:f2
3 6m
4 d11
  d1 p11:f1 p10:f2 p13:f3
  "TAU=vd/2+p3"
  (p1 ph1)
  d4
  (center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )
  d4 UNBLKGRAD
  (p1 ph2)

  d13 p12:f2
  p16:gp5
  d16

```

```

(lalign (p3 ph3 DELTA1):f2 (TAU p2 ph1):f1 )

(p4 ph9):f2
DELTA1
(p3 ph6):f2
d30
(p4 ph1):f2
p16:gp1*EA*-1
d16
DELTA2
(p2 ph1)
d5
(p22 ph1):f3
d10
(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp3
d16
DELTA3
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA3
p19:gp3
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p19:gp4
d16
DELTA4
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA4
p19:gp4
d16
(p1 ph1)
DELTA5
(p2 ph1)
4u
p20:gp2
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
goscnp ph31 cpd2:f2

3m do:f2
3m st ivd
lo to 3 times nbl

3m ipp3 ipp4 ipp5 ipp6 ipp31
lo to 4 times ns

d11 mc #0 to 4
  F1QF()
  F2EA(igrad EA & ip5*2 & rpp3 rpp4 rpp5 rpp6 rpp31, id10 &
dd30 & ip3*2 & ip9*2 & ip6*2 & ip31*2)
exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0 0 0 0 2 2 2 2
ph7=2
ph8=0
ph9=0

```

```

ph31=2 0 0 2

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p2 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p14 : f2 channel - 180 degree high shaped pulse
; (Off-resonance on C2') 1ms @ 600MHz
;p16: homospoil/gradient pulse [1 ms]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d4: 1/(4J(H2'C2'))
;d5: 1/(4J(H1'C1'))
;d23: 1/(4J(CC)) [6.25 ms]
;cnst2: J(H2'C2') [155 Hz]
;cnst3: J(H1'C1') [170 Hz]
;spnam3: f2 channel - 180 degree shaped pulse (Q3.1000)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: >= 32
;o2p: center C1'C2' [77 ppm]
;td2: number of experiments in F2
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI)
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 80.4 : 11 : -5 50 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 80.4%
;gpz3: 11%
;gpz4: -5%
;gpz5: 50%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.20
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100

```

### 7.3.4 Das J-modulierte semi-constant-time HCCH-COSY Experiment

```

;na_hcccasygpphjsc3dsi
;pseudo 3D for the J modulated measurement of J(H2'C2')
;
;      F1(H2') -> F2(C2') -> F2(C1',t1) -> F1(H1',t2)
;
;phase sensitive
;using semi-constant-time in t2
;with decoupling during acquisition
;
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=3D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"p22=p21*2"
"p20=250u"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d13=4u"
"d4=1s/cnst2*4"
"d5=1s/cnst3*4"
"d6=d23-d5"

"DELTA=d5-4u"
"DELTA1=d23/2-p4/2"
"DELTA2=d23-p4/2-p2-p22-d10-d5-p16-d16"
"DELTA3=d5-p19-d16"
"DELTA4=d5-larger(p2,p4)/2-p19-d16"
"DELTA5=p20+d16+8u"

"in10=inf2/2"
"d10=d23-d6"
"d29=d23+d30+p16+d16+p2-8u-d12"
"d30=3u"
"FACTOR1=d29*10000000*2/td2"
"in29=FACTOR1/10000000"
"in30=in10-in29"

aqseq 312

1 ze
  d11 p112:f2 p116:f3 st0
2 d11 do:f2
3 6m
4 d11
  d1 p11:f1 p10:f2 p116:f3
  "TAU=vd/2+p3"
  (p1 ph1)
  d4
  (center (p2 ph1) (p14:sp3 ph1):f2 )

```

```

d4 UNBLKGRAD
(p1 ph2)

d13 p12:f2
p16:gp5
d16

(lalign (p3 ph3 DELTA1):f2 (TAU p2 ph1):f1 )

(p4 ph9):f2
DELTA1 p16:f3
(p3 ph6):f2

d10 cpd3:f3
(p2 ph1)
d6
(p14:sp3 ph1):f2
d30
p16:gp1*EA*-1
d16 p12:f2
(p4 ph1):f2
4u
(p14:sp3 ph1):f2
d29
d12 p12:f2
4u do:f3
(center (p1 ph1) (p3 ph4):f2 )
p19:gp3
d16
DELTA3
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA3
p19:gp3
d16
(center (p1 ph2) (p3 ph5):f2 )
p19:gp4
d16
DELTA4
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
DELTA4
p19:gp4
d16
(p1 ph1)
DELTA5
(p2 ph1)
4u
p20:gp2
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
goscnp ph31 cpd2:f2

3m do:f2
3m st ivd
lo to 3 times nbl

3m ipp3 ipp4 ipp5 ipp6 ipp31
lo to 4 times ns

d11 mc #0 to 4
F1QF()
F2EA(igrad EA & ip5*2 & rpp3 rpp4 rpp5 rpp6 rpp31, id10 &
id30 & dd29 & ip3*2 & ip9*2 & ip6*2 & ip31*2)

```

```

exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 2
ph4=0 0 2 2
ph5=1 1 3 3
ph6=0 0 0 0 2 2 2 2
ph7=2
ph8=0
ph9=0
ph31=2 0 0 2

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p13 : f3 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3: f2 channel - 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p2 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p14 : f2 channel - 180 degree high shaped pulse
; (Off-resonance on C2') 1ms @ 600MHz
;p16: homospoil/gradient pulse [1 ms]
;p21: f3 channel - 90 degree high power pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;d0 : incremented delay (2D) [3 us]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 ms]
;d13: short delay [4 us]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d4: 1/(4J(H2'C2'))
;d5: 1/(4J(H1'C1'))
;d23: 1/(4J(CC)) (J(HN) = 93Hz) [6.25 ms]
;cnst2: J(H2'C2') [155 Hz]
;cnst3: J(H1'C1') [170 Hz]
;spnam3: f2 channel - 180 degree shaped pulse (Q3.1000)
;in0: 1/(2 * SW(N)) = DW(N)
;nd0: 2
;NS: 8 * n
;DS: >= 32
;o2p: center C1'C2' [77 ppm]
;td2: number of experiments in F2
;FnMODE: States-TPPI (or TPPI)
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3 : gp 4
; 80 : 80.4 : 11 : -5 50 for C-13

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 80.4%
;gpz3: 11%
;gpz4: -5%
;gpz5: 50%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100

```

```
;gpnam2: SINE.20  
;gpnam3: SINE.100  
;gpnam4: SINE.100  
;gpnam5: SINE.100
```



### 7.3.5 Das J-modulierte HCC-COSY Experiment

```
;hsqcctetgpsispccj3d
;
;J-mod-CT-HCC-COSY for measurement of  $1J(C1'C2')$  and  $1J(C2'C3')$ 
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=
```

```
prosol relations=<triple>
```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"p2=p1*2"
"p4=p3*2"
"p22=p21*2"
"d4=1s/(cnst2*4)"
"d11=30m"
"d12=20u"
"d24=1s/(cnst2*cnst11)"
"d22=1s/(cnst3*cnst12)"

"in10=inf2/4"

"in30=in10"

"d30=d22/2-larger(p2,p22)/2-p16-d16-4u"
"d10=d22/2-larger(p2,p22)/2-p16-d16"

"DELTA1=p16+d16+8u"
"DELTA2=d4-larger(p2,p8)/2-p19-d16-4u"
"DELTA3=d24-p19-d16"
"DELTA4=d24-p19-d16-p1"
"DELTA5=d23-d10-p16-d16-p22"
"DELTA6=d23-p16-d16-4u"
"DELTA7=p16+d16"

"spofff13=0"
"l0=1"
```

```
aqseq 312
```

```
1 ze
  d11 do:f2
  d12 p112:f2
2 d11 do:f2
3 3m
4 d1
  "TAU=vd/2-p4/2"
  50u UNBLKGRAD
  d12
```

```

(p1 ph1)
4u
p19:gp3
d16 p10:f2
DELTA2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph7):f2 )
DELTA2
4u
p19:gp3
d16 p12:f2 p13:f3
(p1 ph2)
4u
p16:gp4
d16

```

```

(p3 ph9):f2
DELTA7
d10
(center (p2 ph2):f1 (p22 ph1):f3)
d10
p16:gp1*EA
d16
(p4 ph4):f2
4u
p16:gp1*EA*-1
d16
d30
(center (p2 ph2):f1 (p22 ph1):f3)
d30
DELTA7
4u
(p3 ph3):f2
TAU
(p4 ph1):f2
TAU
(p3 ph1):f2
d22
(p4 ph1):f2
d22
(center (p1 ph1) (p3 ph5):f2 )
d24
(center (p2 ph1) (p4 ph1):f2 )
d24
(center (p1 ph2) (p3 ph6):f2 )
4u
p19:gp6
d16 p10:f2
DELTA2
(center (p2 ph1) (p8:sp13 ph1):f2 )
4u
DELTA2
p16:gp6
d16
(p1 ph1)
DELTA1
(p2 ph1)
4u
p16:gp2
d16 p112:f2
4u BLKGRAD
goscnp ph31 cpd2:f2

```

```

3m do:f2
3m st ivd
lo to 3 times nbl

3m ipp3 ipp4 ipp5 ipp6 ipp9 ipp10 ipp31
lo to 4 times ns

4u BLKGRAD

d1 mc #0 to 4
  F1QF()
  F2EA(igrad EA & ip6*2, id10 & dd30 & ip3*2 & ip7*2 & ip9*2
& ip10*2 & ip31*2)
  exit

ph1=0
ph2=1
ph3=0 0 0 0 2 2 2 2
ph4=0 0 0 0 2 2 2 2
ph5=0 0 2 2
ph6=1 1 3 3
ph7=0
ph9=0 2
ph10=3 1
;ph31=0 2 0 2
ph31=0 2 2 0

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default)
;p112: f2 channel - power level for CPD/BB decoupling
;sp3 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (on resonance)
;sp5 : f2 channel - shaped pulse 180 degree (off resonance)
;sp13: f2 channel - shaped pulse 180 degree (adiabatic)
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p3 : f2 channel - 90 degree high power pulse
;p4 : f2 channel - 180 degree high power pulse
;p8 : f2 channel - 180 degree shaped pulse for inversion
(adiabatic)
;p14: f2 channel - 180 degree shaped pulse
;p16: homospoil/gradient pulse
;p22: f3 channel - 180 degree high power pulse
;p28: f1 channel - trim pulse [1 msec]
;d0 : incremented delay (2D) [3 usec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d4 : 1/(4J)XH
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20 : = d23
;d23: d23 = T : 13.3 or 26.6 msec
; 2T (constant time period) = n/J(CC)
;d24: 1/(8J)XH for all multiplicities
; 1/(4J)XH for XH
;cnst2: = J(XH)
;cnst21: CO chemical shift (offset, in ppm)
;in0: 1/(2 * SW(X)) = DW(X)
;in20: 1/(2 * SW(X)) = DW(X) = in0
;nd0: 2
;NS: 4 * n

```

```
;DS: 32
;td1: number of experiments
;FnMODE: echo-antiecho
;cpd2: decoupling according to sequence defined by cpdprg2
;pcpd2: f2 channel - 90 degree pulse for decoupling sequence

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2
;                          80 : 40.1      for C-13
;                          80 : 16.1      for N-15

;for z-only gradients:
;gpz1: 80%
;gpz2: 40.1% for C-13, 16.2% for N-15
;gpz3: 20%
;gpz4: 50%
;gpz5: 5%
;gpz6: 8%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
;gpnam4: SINE.100
;gpnam5: SINE.100
;gpnam6: SINE.100
```

## 7.4 Python Skripte

### 7.4.1 Skript zur Auswertung von E.COSY Spektren (je eine Zeile pro Signal)

```

from de.bruker.nmr.an.dconld import DconUtil
from de.bruker.nmr.jutil.misc import UtilDiscFunc
from de.bruker.nmr.jview.data import NMRData
from de.bruker.nmr.mfw.root import *
from math import sqrt
import os

XCMD("dpl") # Get limits from currently visible region
f1p = float(GETPAR("2 F1P"))
f2p = float(GETPAR("2 F2P"))

hz = float(GETPAR("2s HZpPT"))
print hz

oldDataset = CURDATA()
RSR(str(sys.argv[1]), str(sys.argv[1]), "y")
procdatal = list(GETPROCdata(f1p, f2p))
#print procdatal
#print len(procdatal)
CLOSEWIN(CURDATA())
RE(oldDataset)

oldDataset = CURDATA()
RSR(str(sys.argv[2]), str(sys.argv[2]), "y")
procdatal2 = list(GETPROCdata(f1p, f2p))
#print procdatal2
#print len(procdatal2)
CLOSEWIN(CURDATA())
RE(oldDataset)

diffs = []
shifts = []

for x in range(len(procdatal)):
    summe = sum(abs(procdatal[i] - procdatal2[i]) for i in
range(len(procdatal)))
    diffs.append(summe)
    tmp = procdatal.pop(0)
    procdatal.append(tmp)

for x in range(len(procdatal)):
    shift = x * hz
    shifts.append(shift)

#print diffs
print shifts
disprop = GET_DISPLAY_PROPS(xStart = str(0), xEnd =
str(max(shifts)), xUnit = 'Hz', xLegend='shift',
yLegend='difference')
DISPLAY_DATALIST_XY([diffs,], [shifts,], propList = [disprop,],
winTitle = "ECOSY analysis")

```

```
#print disprop

for y in range(len(diffs)):
    if diffs[y] == min(diffs):
        minimum = shifts[y]
result="ECOSY analysis of rows "+str(sys.argv[1])+" and
"+str(sys.argv[2])+"\n\nCoupling constant: "+str(round(minimum,
3))+" Hz."
VIEWTEXT(title="Result", header="", text=result, modal=1)
```

## 7.4.2 Skript zur Auswertung von E.COSY Spektren (Summation der Zeilen eines Signals)

```

from de.bruker.nmr.an.dconld import DconUtil
from de.bruker.nmr.jutil.misc import UtilDiscFunc
from de.bruker.nmr.jview.data import NMRData
from de.bruker.nmr.mfw.root import *
from math import sqrt
import os

low1, high1 = str(sys.argv[1]).split("-")
low2, high2 = str(sys.argv[2]).split("-")

XCMD("dpl") # Get limits from currently visible region
f1p = float(GETPAR("2 F1P"))
f2p = float(GETPAR("2 F2P"))

hz = float(GETPAR("2s HZpPT"))
#print hz

oldDataset = CURDATA()
range1 = CURDATA()
range1[2] = "1"+low1
#RSR(str(sys.argv[1]),str(sys.argv[1]),"y")
XCMD("f2sum %s %s %s" %(low1, high1, "1"+low1))
RE(range1)
procdatal = list(GETPROCdata(f1p,f2p))
#print procdatal
#print len(procdatal)
CLOSEWIN(CURDATA())
RE(oldDataset)

oldDataset = CURDATA()
range2 = CURDATA()
range2[2] = "1"+low2
#RSR(str(sys.argv[2]),str(sys.argv[2]),"y")
XCMD("f2sum %s %s %s" %(low2, high2, "1"+low2))
RE(range2)
procdatal2 = list(GETPROCdata(f1p,f2p))
#print procdatal2
#print len(procdatal2)
CLOSEWIN(CURDATA())
RE(oldDataset)

diffs = []
shifts = []

for x in range(len(procdatal)):
    summe = sum(abs(procdatal[i] - procdatal2[i]) for i in
range(len(procdatal)))
    diffs.append(summe)
    tmp = procdatal.pop(0)
    procdatal.append(tmp)

for x in range(len(procdatal)):

```

---

```

    shift = x * hz
    shifts.append(shift)

#print diffs
#print shifts
disprop = GET_DISPLAY_PROPS(xStart = str(0), xEnd =
str(max(shifts)), xUnit = 'Hz', xLegend='shift',
yLegend='difference')
DISPLAY_DATALIST_XY([diffs,], [shifts,], propList = [disprop,],
winTitle = "ECOSY analysis")
#print disprop

minimum_diffs = min(diffs)

for y in range(len(diffs)):
    if diffs[y] == minimum_diffs:
        minimum = shifts[y]

devis = []

for z in range(len(diffs)):
    if diffs[z] <= 1.02*minimum_diffs:
        devis.append(shifts[z])

if minimum-min(devis) >= max(devis)-minimum:
    devi=minimum-min(devis)
else:
    devi=max(devis)-minimum

result="ECOSY analysis of rows "+str(sys.argv[1])+" and
"+str(sys.argv[2])+"\n\nCoupling constant: "+str(round(minimum,
3))+" +- "+str(round(devi, 3))+" Hz."
VIEWTEXT(title="Result", header="", text=result, modal=1)

```



## 8 Danksagung

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Harald Schwalbe für die Möglichkeit bedanken, diese Arbeit in seiner Gruppe anfertigen zu können. Ich möchte mich außerdem für die spannenden Aufgabenstellungen, die ständige Diskussionsbereitschaft, sowie die freundschaftliche Atmosphäre bedanken. Ohne alle diese Voraussetzungen wäre das Anfertigen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Er konnte mir stets weiterhelfen, egal ob bei größeren Problemen der Interpretation oder kleiner experimenteller Details.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich außerdem bei Dr. Christian Richter, der mich an die NMR Spektroskopie herangeführt hat. Ihm habe ich es zu verdanken, dass meine Begeisterung für den praktischen Aspekt der NMR Spektroskopie geweckt wurde, die bis heute andauert. Während meiner Arbeit stand er mir stets mit Rat und Tat zur Seite.

Bei Dr. Henry Jonker möchte ich mich ebenfalls besonders bedanken. Auf seine Unterstützung konnte ich mich stets verlassen, in allen Fragen betreffend Strukturrechnung und den Umgang mit diversen Programmen rund um NMR Strukturrechnung. Ich danke ihm außerdem für die zahllosen Diskussionen, viele Teile dieser Arbeit betreffend.

Ich danke außerdem der wechselnden Besetzung des „Boys Lab“. Auch hier möchte ich einigen Leuten ganz besonders danken, die vor allem für die technische Unterstützung des ganzen Arbeitskreises gesorgt haben. Martin Hähnke und Fabian Hiller danke ich für viel Unterstützung bei allem was Rechner, Programmierung und sonstige technische Probleme angeht.

Bei Dr. Janina Buck und Anna Wacker bedanke ich mich vor allem für die Hilfe im Biolabor, speziell bei der RNA Probenpräparation.

Für die ständige Diskussionsbereitschaft danke ich außerdem Dr. Boris Fürtig, der stets bereit war seine Erfahrung rund um NMR an RNA zu teilen.

Danken möchte ich außerdem dem „Taylor Room“ bzw. Florian Buhr, Florian Sochor, Jochen Albert Stehle, Robert Silvers und Dominic Wagner für die ständige

Diskussionsbereitschaft und ihre kreativen Lösungsvorschläge für die Probleme des Laboralltags.

Bedanken möchte ich mich auch beim „Girls Lab“, hier vor allem bei Anna Lena Lieblein und Karin Rybka für die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Melanie Koschinat danke ich für das Zurverfügungstellen der 37mer RNA Probe.

Bei Elke Stirnal und Marie Anders-Maurer bedanke ich mich für die Hilfe im Labor, die Aufreinigung von Proben, die Synthese von Peptiden und vor allem bei Elke für die großartigen Arbeitsbedingungen in den Labors des Arbeitskreises.

Elena Hartmann und Anna Paulus danke ich für die Hilfe bei allem was Reisen oder sonstige Bürokratie angeht, Ihre Hilfe war stets eine große Entlastung.

Ich danke außerdem allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des AK Schwalbe. Bei den ehemaligen Mitgliedern möchte ich mich vor allem bei Dr. Steffen Grimm, Dr. Jürgen Graf, Dr. Christian Schlörb, Dr. Karla Werner und Dr. Stephan Rehm bedanken. Sie haben mich zu Beginn der Diplomarbeit herzlich aufgenommen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mir durch ihre andauernde Unterstützung über viele Jahre hinweg das Studium ermöglicht hat.

## 9 Lebenslauf

### Angaben zur Person

---

|                     |                |
|---------------------|----------------|
| Name                | Daniel Mathieu |
| Geburtsdatum        | 13.05.1981     |
| Geburtsort          | Hanau am Main  |
| Staatsangehörigkeit | deutsch        |
| Familienstand       | verheiratet    |

### Ausbildung

#### *Schulischer Werdegang*

---

|             |                                      |
|-------------|--------------------------------------|
| 1987 - 1991 | Grundschule Bruchköbel-Rossdorf      |
| 1991 - 2000 | Hohe Landesschule Hanau              |
| Juni 2000   | Beendigung der Schule mit dem Abitur |

#### *Studium*

---

|                   |   |
|-------------------|---|
| 2001 - 2007       | Studium der Chemie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main  |
| 01/2005 – 10/2006 | Teilnahme am Frankfurter Fachkolleg der Studienstiftung des Deutschen Volkes für Chemie und Biochemie   |
| März 2007         | Beendigung des Studiums mit dem Diplom, Thema der Diplomarbeit: „Entwicklung neuer Methoden zur Messung von Residualen Dipolaren Kopplungen an Naturstoffen“, Note „Mit Auszeichnung“ (1.0) |

- 04/2007 – 10/2011     Doktorarbeit an der Goethe Universität Frankfurt im Arbeitskreis Prof. Harald Schwalbe mit dem Titel „Methoden zur Konformationsbestimmung an Peptiden und Nukleinsäuren mittels skalarer und dipolarer Kopplungen“
- 2007 – 2008             Doktorandenstipendium der Degussa Stiftung

---

*Akademische Lehrer an der Goethe Universität (alphabetisch)*

---

Prof. Dr. Norbert Auner, Prof. Dr. Wolf Aßmus, Prof. Dr. Bernd Brutschy, Prof. Dr. Ernst Egert, Prof. Dr. Joachim Engels, Prof. Dr. Michael Göbel, Prof. Dr. Max Holthausen, Prof. Dr. Bernd Kolbesen, Prof. Dr. Thomas Prisner, Prof. Dr. Wilhelm Püttmann, Prof. Dr. Magnus Rüping, Prof. Dr. Martin U. Schmidt, Prof. Dr. Gisbert Schneider, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Prof. Dr. Gerhard Stock, Prof. Dr. Andreas Terfort, Prof. Dr. Josef Wachtveitl, Prof. Dr. Matthias Wagner

---

*Mitgliedschaft in Gremien der Universität*

---

- 2004 - 2006             Mitglied des Fachschaftsrates Fachbereich 14
- 2004 – 2005             Mitglied des Fachbereichsrates Fachbereich 14
- 2004 - 2006             Mitglied des Lehr- und Studiausschusses Fachbereich 14

---

*Sonstige Tätigkeiten*

---

- 4.10.00 – 31.8.01     Zivildienst beim Deutschen Roten Kreuz Kreisverband Hanau im Bereich Krankentransport und Unfallrettung.

---

**Beruflicher Werdegang**

---

- Seit 1.10.2011         Beschäftigung bei der Firma Bruker BioSpin GmbH als Applikations Chemiker

## 10 Liste der Publikationen

“Total Synthesis and NMR Investigations of Cyindramide”, Cramer N., Buchweitz M., Laschat S., Frey W., Baro A., Mathieu D., Richter C., Schwalbe H., *Chem. Eur. J.* 2006, 12, 2488-2503.

“Synthesis and biological properties of cylindramide derivatives: evidence for calcium-dependent cytotoxicity of tetramic acid lactams.”, Cramer N., Helbig S., Baro A., Laschat S., Diestel R., Sasse F., Mathieu D., Richter C., Kummerlöwe G., Luy B., Schwalbe H., *ChemBiochem* 2008, 9, 2474-2486.

“Intrinsic propensities of amino acid residues in GxG peptides inferred from amide I' band profiles and NMR scalar coupling constants.”, Hagarman A., Measey T.J., Mathieu D., Schwalbe H., Schweitzer-Stenner R., *J. Am. Chem. Soc.* 2010, 132, 540-51.

“Amino Acids with Hydrogen Bonding Side Chains have an Intrinsic Tendency to Sample Various Turn Conformations in Aqueous Solution”, Hagarman A., Mathieu D., Toal S., Measey T.J., Schwalbe H., Schweitzer-Stenner R., *Chem. Eur. J.* 2011, 17, 6789-6797.

“Mapping conformational dynamics in unfolded polypeptide chains using short model peptides by NMR spectroscopy”, Mathieu D., Rybka K., Graf J., Schwalbe H. in “Peptide Folding, Misfolding and Nonfolding”, Wiley VCH, Hoboken, 2012.

“Structure and dynamics of the deoxyguanosine-sensing riboswitch studied by NMR spectroscopy”, Wacker A., Buck J., Mathieu D., Richter C., Wöhnert J., Schwalbe H., *Nucleic Acids Res.* 2011, 39, 6802-6812.